



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

O PAPEL DAS AMIBAS NAS INFECÇÕES ASSOCIADAS AOS CUIDADOS DE SAÚDE

Trabalho submetido por
Catarina dos Reis Barreiros
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

novembro de 2016



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

O PAPEL DAS AMIBAS NAS INFECÇÕES ASSOCIADAS AOS CUIDADOS DE SAÚDE

Trabalho submetido por
Catarina dos Reis Barreiros
para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Professora Doutora Catarina Bernardes

novembro de 2016

Dedicatória

À minha querida Mãe.

Tomara um dia eu ser metade da pessoa que tu és.

Amo-te desde sempre e para sempre.

Agradecimentos

À Professora Catarina Bernardes, por estar sempre disponível para me ajudar e esclarecer quaisquer dúvidas que tivesse. O seu interesse, dedicação e sabedoria valorizaram exponencialmente este trabalho!

À Mãe, que dedicou a sua vida a mim e à minha irmã, e que sempre nos apoiou e incentivou para tornarmos os nossos sonhos realidade. Tudo isto é fruto teu!

Ao Pai, pelos telefonemas diários com palavras de incentivo e carinho. Mesmo longe, estás sempre no meu coração.

Ao Tio Renato. Sem si, nada disto seria possível!

À Madrinha, pela constante companhia, principalmente naquelas noites em que dormir estava fora de questão.

À avó Maria, a melhor avó que existe no Mundo. Obrigada pelo teu amor e dedicação!

Ao meu Fofinho, que todos os dias me mostra o significado de verdadeira amizade e amor. Foste a ajuda mais preciosa que tive! Obrigada pelo carinho, pela paciência e por todas as horas e dias que me dispensaste!

À Bruninha pela amizade. Nem a distância impediu que me ajudasses em tudo o que precisei. És a minha farmacêutica preferida!

À Dra. Dulce, à Dra. Teresa, ao Dr. Rui, ao Gonçalo, à Isabel, à Dra. Maria João, à Dra. Carla e à Dra. Ana Cristina! Inspiram-me a ser uma melhor farmacêutica!

Resumo

O termo “infecção associada aos cuidados de saúde” refere-se à infecção adquirida por um doente, em qualquer local onde são prestados cuidados de saúde, e que não estava presente, nem em incubação, na altura da sua admissão. Estas infeções têm uma elevada prevalência a nível mundial, acarretando importantes custos para os sistemas de saúde. Podem ser causadas por diversos microrganismos, como bactérias, vírus, fungos e parasitas. As amibas de vida livre são protozoários que provocam infeções que não têm grande destaque na comunidade médica por serem pouco comuns, apesar de poderem ser graves. São amibas não parasitas, não necessitam de um hospedeiro para sobreviver e completar o seu ciclo de vida, e podem funcionar como reservatório para outros microrganismos patogénicos, particularmente bactérias que adquirem resistência aos seus mecanismos destrutivos, conseguindo sobreviver nos trofozoítos ou nos quistos. Assim, tendo em conta que as amibas são organismos bastante resistentes a diversos fatores ambientais, oferecem proteção aos microrganismos que alojam, o que favorece a sua permanência no ambiente e aumenta a probabilidade de causarem infeções em humanos. Consequentemente, a existência de amibas no meio ambiente dos locais onde se prestam cuidados de saúde pode não só facilitar a sobrevivência de múltiplos agentes patogénicos, como também contribuir para a sua disseminação e até os prepara para adquirirem capacidade de sobreviverem dentro de macrófagos e, assim, escaparem às defesas do organismo humano. Bactérias patogénicas, como *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp. e *Campylobacter* spp., são exemplos de microrganismos que beneficiam das interações que estabelecem com amibas de vida livre. Neste trabalho pretende-se fazer uma revisão geral sobre as IACS e dos conhecimentos que as relacionam com as amibas, com o objetivo de se chamar à atenção para o facto destes protozoários poderem constituir um dos fatores que estão na base de um problema de saúde pública.

Palavras-chave: infecção associada aos cuidados de saúde, amibas de vida livre, infecção nosocomial, resistência bacteriana

Abstract

The term "healthcare-associated infection" refers to the infection acquired by a patient, wherever healthcare services are provided, that was not present or incubating at the time of admission. These infections are highly prevalent worldwide, leading to significant costs to health systems. They can be caused by various microorganisms, such as bacteria, viruses, fungi and parasites. Free-living amoebae are protozoa that cause infections that are not prominent in the medical community because they are uncommon, although they may be serious. They are non-parasitic amoebas that do not need a host to survive or complete their life cycle, and can act as reservoir for other pathogenic microorganisms, particularly bacteria that acquire resistances to their destructive mechanisms, surviving in trophozoites or cysts. Thus, since amoebae are organisms that are resistant to several environmental factors, they offer protection to the microorganisms they harbour, which favors their permanence in the environment and increases the probability of causing human infections. Consequently, the existence of amoebae in the environment of health care settings not only facilitates the survival of multiple pathogens, but also contributes to their dissemination and even prepares them to survive within macrophages and to escape the defenses of the human organism. Pathogenic bacteria, such as *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp. and *Campylobacter* spp., are examples of microorganisms that benefit from the interactions they establish with free-living amoebae. In this work I intend to make a general review about healthcare-associated infections and the knowledge that relates them with amoebas, in order to call attention to the fact that these protozoa may constitute one of the factors that are the basis of a public health problem.

Keywords: healthcare-associated infection, free-living amoebae, nosocomial infection, bacterial resistance

Índice Geral

Resumo	1
Abstract	3
Índice de Figuras	7
Índice de Tabelas	9
Lista de Abreviaturas	11
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	13
1.1. Infecções associadas aos cuidados de saúde.....	13
1.1.1. Prevalência.....	14
1.1.1.1. IACS no Mundo	15
1.1.1.2. IACS em Portugal.....	17
1.1.2. Epidemiologia.....	18
1.1.3. Tipos de IACS e respetivos fatores de risco.....	21
1.1.3.1. Infecções do local cirúrgico (ILC)	22
1.1.3.2. Pneumonia	23
1.1.3.3. Infecções do trato urinário (ITU)	24
1.1.3.4. Infecções da corrente sanguínea (ICS).....	25
1.1.4. Prevenção das IACS	25
1.1.5. Custo associado às IACS	28
CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO	31
2.1. Infecções causadas por AVL	32
2.1.1. <i>Acanthamoeba</i> spp.....	32
2.1.2. <i>Balamuthia mandrillaris</i>	34
2.1.3. <i>Naegleria fowleri</i>	36
2.2. AVL como reservatório para bactérias patogénicas	37
2.2.1. <i>Legionella</i> spp. como simbiontes facultativos das AVL	38
2.2.1.1. Taxonomia da <i>L. pneumophila</i>	38
2.2.1.2. Patogénicos amebianos semelhantes à <i>Legionella</i> (PASL).....	38
2.2.1.3. Ciclo de vida da <i>L. pneumophila</i>	39
2.2.1.4. Transmissão da <i>L. pneumophila</i>	40
2.2.1.5. Fatores de virulência da <i>L. pneumophila</i>	41
2.2.2. <i>Mycobacterium</i> spp. como simbiontes facultativos das AVL	43

2.2.2.1.	Taxonomia de <i>Mycobacterium</i> spp.....	43
2.2.2.2.	Ecologia de <i>Mycobacterium</i> spp.....	44
2.2.2.3.	Fatores de virulência de <i>Mycobacterium</i> spp.	44
2.2.3.	<i>Campylobacter jejuni</i> como simbionte facultativo das AVL	49
2.2.3.1.	Ecologia de <i>Campylobacter jejuni</i>	50
2.2.3.2.	Fatores de virulência de <i>Campylobacter jejuni</i>	50
CAPÍTULO III – CONCLUSÕES.....		53
CAPÍTULO IV – BIBLIOGRAFIA.....		55

Índice de Figuras

Figura 1. Prevalência observada e prevalência prevista de infeções adquiridas no hospital com intervalo de confiança de 95% (retirado e adaptado de Zarb et al., 2012).....	16
Figura 2. Cadeia da infeção (retirado de Cardoso, 2015).....	18
Figura 3. Percentagem de microrganismos mais isolados em hospitais europeus (retirado e adaptado de Zarb et al., 2012).....	19
Figura 4. Ciclo de vida e portas de entrada de <i>Acanthamoeba</i> (retirado e adaptado de “ <i>Acanthamoeba</i> biology,” 2012).....	33
Figura 5. Ciclo de vida e portas de entrada de <i>Balamuthia mandrillaris</i> (retirado e adaptado de “Pathogen & Environment of <i>Balamuthia mandrillaris</i> ,” 2016).....	35
Figura 6. Ciclo de vida e portas de entrada de <i>Naegleria fowleri</i> (retirado e adaptado de “Free living amebic infections,” 2013).....	37
Figura 7. A infeção por <i>L. pneumophila</i> é muito semelhante em macrófagos (A) e em amibas (B) (retirado de Molmeret et al., 2005).....	40
Figura 8. Ciclo de vida intracelular da <i>L. pneumophila</i> (retirado e adaptado de Franco, Shuman, & Charpentier, 2009).....	41
Figura 9. Células infetadas por <i>L. pneumophila</i> (retirado de Molmeret et al., 2004).....	42
Figura 10. Células de AVL infetadas com micobactérias, fotografadas em microscopia eletrónica de varrimento (A, A’ e B) e de transmissão (C, C’ e C’’) (retirado e adaptado de Hagedorn et al., 2009).....	46
Figura 11. A estirpe selvagem de <i>M. marinum</i> forma rastos de actina, visíveis por microscopia eletrónica (retirado de Kennedy et al., 2012).....	47
Figura 12. Imagens time-lapse onde é possível observar o movimento de <i>M. marinum</i> em macrófagos (retirado e adaptado de Stamm et al., 2003).....	48
Figura 13. Observação ao microscópio eletrónico de transmissão da fagocitose de <i>M. xenopi</i> por <i>A. polyphaga</i> (retirado de Drancourt et al., 2007).....	49

Figura 14. As células de *C. jejuni* concentram-se em determinados locais da membrana celular de *A. polyphaga* (A e B) e, após algum tempo, encontram-se em vacúolos amebianos (C, D e E) (retirado de Axelsson-Olsson et al., 2005).....51

Índice de Tabelas

Tabela 1. Estimativa de IACS nos hospitais dos Estados Unidos em 2011 (retirado e adaptado de “HAI data and statistics,” 2016).....	15
--	----

Lista de Abreviaturas

AVL – Amibas de vida livre

ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control

EGA – Encefalite granulomatosa amebiana

IACS – Infecção/ções associada/s aos cuidados de saúde

ICS – Infecções da corrente sanguínea

ILC – Infecções do local cirúrgico

ITU – Infecções do trato urinário

MPA – Meningoencefalite primária amebiana

MNT – Micobactérias não tuberculosas

PASL – Patogénicos amebianos semelhantes à *Legionella*

PAV – Pneumonia associada ao ventilador

QA – Queratite por *Acanthamoeba*

SNC – Sistema nervoso central

VCL – Vacúolo contendo *Legionella*

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

1.1. Infecções associadas aos cuidados de saúde

A infeção hospitalar existe desde a criação dos hospitais (Ferreira, 2011), sendo desde sempre responsável por elevada morbilidade e mortalidade (Goulão, 2014). As condições em que eram efetuadas as cirurgias nos hospitais, e o facto de os pacientes partilharem o mesmo quarto, sem qualquer tipo de isolamento, tornavam o risco de infeção mais elevado do que se a mesma cirurgia fosse efetuada nas casas dos doentes.

O termo “infeção hospitalar” foi utilizado pela primeira vez no século XIX, pelo inglês James Simpson, que sugeriu que esta ocorria devido à fraca ventilação dos quartos dos hospitais e à estagnação do ar, o que se poderia evitar caso as divisões fossem arejadas regularmente (Mourud, 2010). Mais tarde, em 1847, Semmelweis, obstetra num hospital de Viena, demonstrou inequivocamente que, nesse hospital, a taxa de mortalidade de recém-nascidos era superior à que ocorria com bebés nascidos em domicílio, onde os partos eram assistidos por parteiras. Semmelweis concluiu que tal acontecia devido ao facto de os médicos por um lado estudarem anatomia em cadáveres e, por outro, prestarem assistência às grávidas, sem higienizarem as mãos entre as diversas atividades. Propôs, então, a lavagem obrigatória das mãos com uma solução antisséptica, com o objetivo de diminuir o aparecimento das infeções e, consequentemente, a taxa de mortalidade neonatal, o que se cumpriu (Ferreira, 2011; Goulão, 2014; Mourud, 2010; Samuelsson, 2013).

Com a descoberta dos antibióticos, no século XX, e com a evolução dos cuidados de higiene nas práticas hospitalares, acreditava-se que a ocorrência de infeções iria diminuir drasticamente. Inicialmente, verificou-se essa diminuição, mas ao fim de algum tempo, começou a observar-se resistência antimicrobiana, o que reacendeu a problemática das infeções hospitalares (Ferreira, 2011; Goulão, 2014; Mourud, 2010).

Em 1972, foi criada a *Association for Practitioners in Infection Control*, com o objetivo de promover a implementação de medidas de controlo de infeção nos hospitais. Ao longo dos anos, essas medidas foram sendo alteradas e melhoradas de forma a reduzir ao máximo as taxas de infeção (Ferreira, 2011).

Nos últimos anos, o sistema de saúde tem sofrido alterações, entre as quais a transição de uma parte considerável dos cuidados de saúde dos hospitais para o regime ambulatorio.

Assim, foi sugerido uma alteração do termo “infeções hospitalares” para o de “infeções associadas aos cuidados de saúde” (IACS), sendo esta designação mais abrangente, já que se refere a todos os locais onde são prestados cuidados de saúde, quer sejam unidades de saúde primárias, centros de saúde ou outras instituições semelhantes (Direcção-Geral da Saúde, 2007).

Assim, uma IACS é uma infeção adquirida pelo paciente devido ao contacto com microrganismos patogénicos presentes no hospital, ou qualquer outra instituição prestadora de cuidados de saúde, independentemente dessa infeção se manifestar durante o período de internamento ou após a alta do utente, pelo que essa infeção não estava presente no paciente ou em incubação no momento da admissão (Martins, 2001). Assim, por exemplo, se aquando da admissão hospitalar de um doente, este apresentar uma infeção em curso, que se complique durante o internamento, essa infeção não é considerada uma IACS, mas sim uma infeção da comunidade. Existem outras infeções que também não são consideradas IACS, tais como infeções que surgem nos neonatais, até 48 horas após o parto, adquiridas por transmissão vertical através da placenta; infeção latente reativada; entre outras. Por outro lado, estão incluídas nas IACS as infeções adquiridas pelos profissionais, relacionadas com a prestação de cuidados de saúde, ou seja, infeções ocupacionais (Goulão, 2014).

As causas das IACS são multifatoriais, mas a maioria delas deve-se, sobretudo, à utilização de dispositivos médicos ou a cirurgias e outros procedimentos invasivos (Fernandes, 2013).

1.1.1. Prevalência

As IACS são a maior causa de mortalidade e morbilidade nos hospitais (Head et al., 2014), constituindo um problema de carácter universal e um dos riscos *major* para os doentes ao serem hospitalizados. São muitos os fatores que contribuem para o aumento da prevalência das IACS, como por exemplo, a imunodeficiência, as técnicas invasivas de diagnóstico, as práticas de assistência aos doentes e o ambiente que os rodeia (Fernandes, 2013).

1.1.1.1. IACS no Mundo

Estima-se que a nível mundial, diariamente, cerca de 1,4 milhões de doentes adquirem infeções nos hospitais (Cardoso, 2015).

No caso dos Estados Unidos, por exemplo, no ano 2002, ocorreram cerca de 1,7 milhões de IACS, delas resultando aproximadamente 99 000 mortes (Klevens et al., 2007). Noutro estudo relativo à prevalência de IACS nos hospitais dos Estados Unidos, é reportado que no ano 2011 existiram cerca de 722 000 IACS (tabela 1); mais de metade dessas IACS surgiram fora da unidade de cuidados intensivos, a principal doença foi pneumonia e aproximadamente 75 000 pacientes, com IACS, faleceram durante a sua hospitalização (“HAI data and statistics,” 2016).

Tipo de infeção	<i>Número de ocorrências</i>
Pneumonia	157 500
Doença gastrointestinal	123 100
Infeções do sistema urinário	93 300
Infeções do sistema circulatório	71 900
Infeções do local cirúrgico	157 500
Outras infeções	118 500
Número total estimado de infeções	721 800

Tabela 1. Estimativa de IACS nos hospitais dos Estados Unidos em 2011 (retirado e adaptado de “HAI data and statistics,” 2016).

Na Europa, o *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) realizou um estudo de prevalência das IACS entre maio de 2011 e novembro de 2012, no qual participaram 33 países (30 países membros da União Europeia, Noruega, Islândia e Croácia), representados na figura 1. Os dados foram obtidos de 1149 hospitais e 273 753 pacientes (Suetens, Hopkins, Kolman, & Hogberg, 2013)

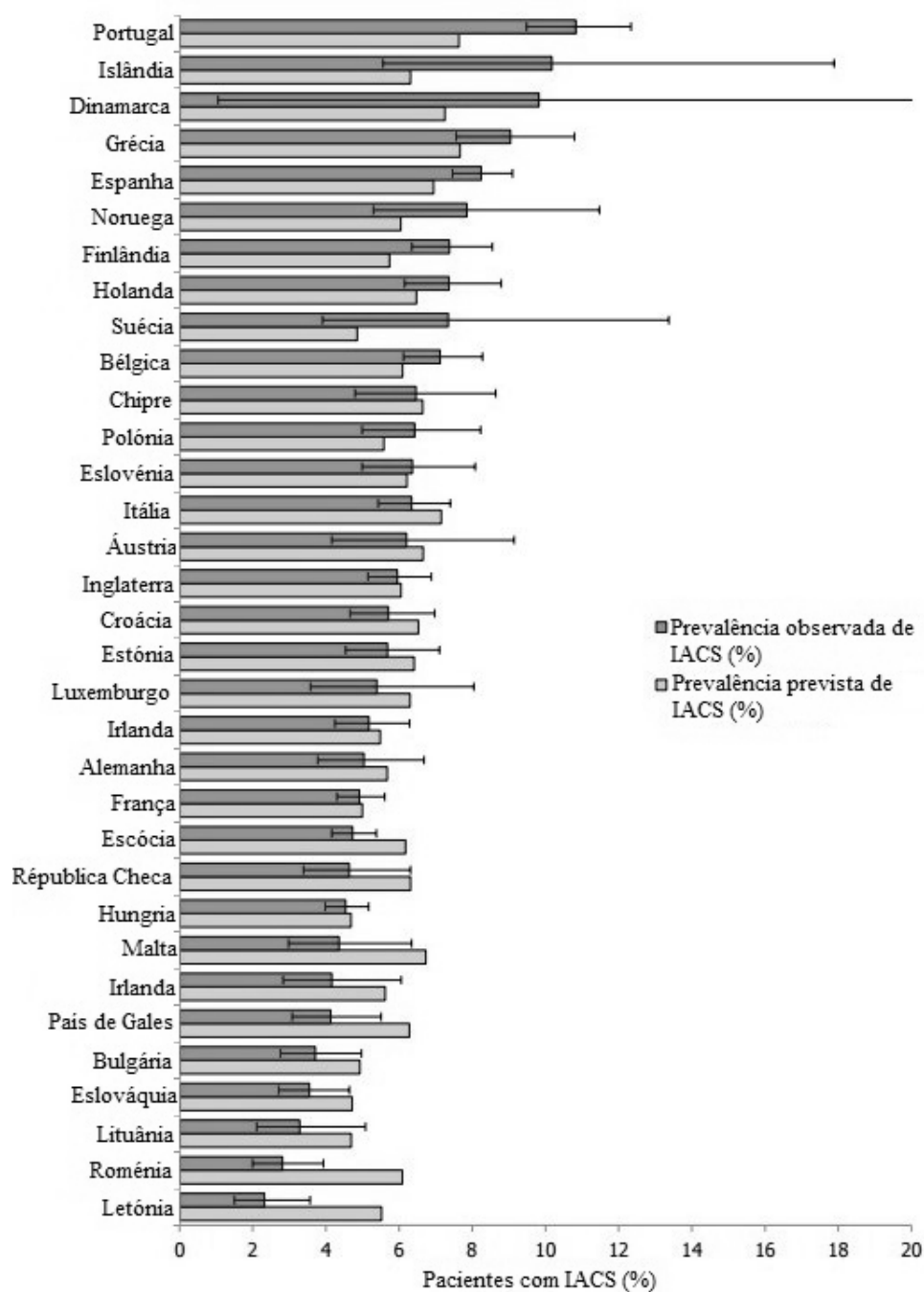


Figura 1. Prevalência observada e prevalência prevista de infecções adquiridas no hospital com intervalo de confiança de 95% (retirado e adaptado de Zarb et al., 2012).

No final do estudo, concluiu-se que as IACS têm uma prevalência média de 5,7%, o que equivale a uma média de 81 089 pacientes com IACS por dia nos hospitais europeus participantes no estudo. Assim, o número total estimado de pacientes com IACS no período do estudo foi de 3,2 milhões, o que demonstra que estas infeções representam um importante problema de saúde na Europa. Neste estudo também se observou que os tipos de IACS mais comuns são as infeções do local cirúrgico (19,6%), pneumonia (19,4%), infeções do sistema urinário (19,0%), infeções do sistema sanguíneo (10,6%) e infeções do sistema gastrointestinal (7,6%) (Zarb et al., 2012).

1.1.1.2. IACS em Portugal

Em 2009 foi realizado um Inquérito Nacional de Prevalência de Infeção, pelo Programa Nacional de Controlo de Infeção, no qual participaram 144 hospitais portugueses e onde foram estudados 21 459 doentes. Deste inquérito resultou a taxa de prevalência de IACS com o valor de 11,03% em 9,8% doentes hospitalizados (Pina, Ferreira, Marques, & Matos, 2010).

Mais tarde, em 2012, realizou-se um estudo de prevalência da ECDC, que mostra que, nessa altura, Portugal apresentava a maior taxa de prevalência de IACS em comparação com os restantes países da Europa (Cardoso, 2015).

Nesse estudo foram selecionados 43 hospitais portugueses para integrar a amostra europeia, representados por 18 258 pacientes. A taxa de IACS em Portugal foi de 10,6%, bastante superior à europeia, cujo valor foi de 6,1%. Também foi superior à média europeia a prevalência das IACS em Portugal, relativamente ao género masculino (12,4% vs. 7,2%), e ao género feminino (8,8% vs. 5,4%) (Pina, Paiva, Nogueira, & Silva, 2012).

Os tipos de IACS mais frequentes, em Portugal, são idênticos aos do cenário europeu, embora com percentagens ligeiramente diferentes (local cirúrgico – 16%, pneumonia – 29%, trato urinário – 23%, corrente sanguínea – 8% e sistema gastrointestinal – 6% (Zarb et al., 2012).

1.1.2. Epidemiologia

O processo infeccioso implica diversas etapas etiológicas, formando uma cadeia (figura 2), que só se verifica na presença de todos os seus elementos, quebrando-se o ciclo caso tal não aconteça (Cardoso, 2015).

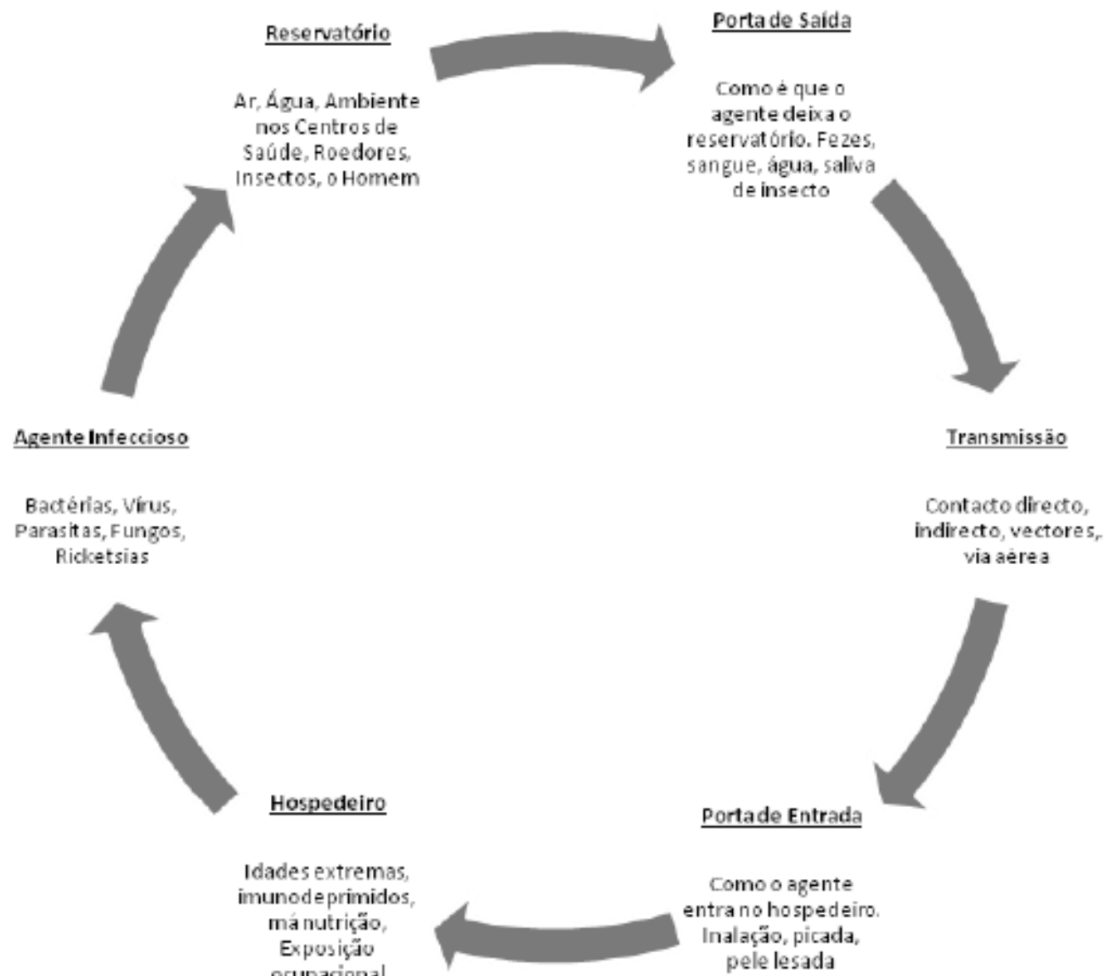


Figura 2. Cadeia da infeção (retirado de Cardoso, 2015)

Durante o período de hospitalização ou de prestação de cuidados de saúde, o paciente pode ser exposto a uma miríade de microrganismos, onde se podem incluir bactérias, vírus, fungos e parasitas (Cardoso, 2015; World Health Organization, 2002). Quando um desses microrganismos provoca uma doença, ou seja, origina uma IACS, é considerado o **agente infeccioso**. Assim, este agente microbiológico, quando encontra **uma via de transmissão**, pode desencadear o processo infeccioso depois de entrar no **hospedeiro**, por uma **porta de entrada**, que pode ser, por exemplo, uma lesão na pele ou mucosas, ou

através dos tratos respiratório, urinário ou digestivo. Por vezes, os microrganismos patogénicos sobrevivem em **reservatórios**, dos quais dependem para se multiplicar ou alimentar. Por fim, o local por onde o agente infeccioso sai do corpo do hospedeiro ou do reservatório, designa-se **porta de saída** (Cardoso, 2015).

De acordo com o relatório da ECDC referente a 2012, em 54% das IACS foi identificado o microrganismo responsável, valores que variam entre 38,5%, no caso de pneumonias e infeções do trato respiratório inferior, e 94,7% em infeções do sistema circulatório (Zarb et al., 2012).

Os microrganismos que podem causar IACS são bastante diversificados, como se pode verificar na figura 3.

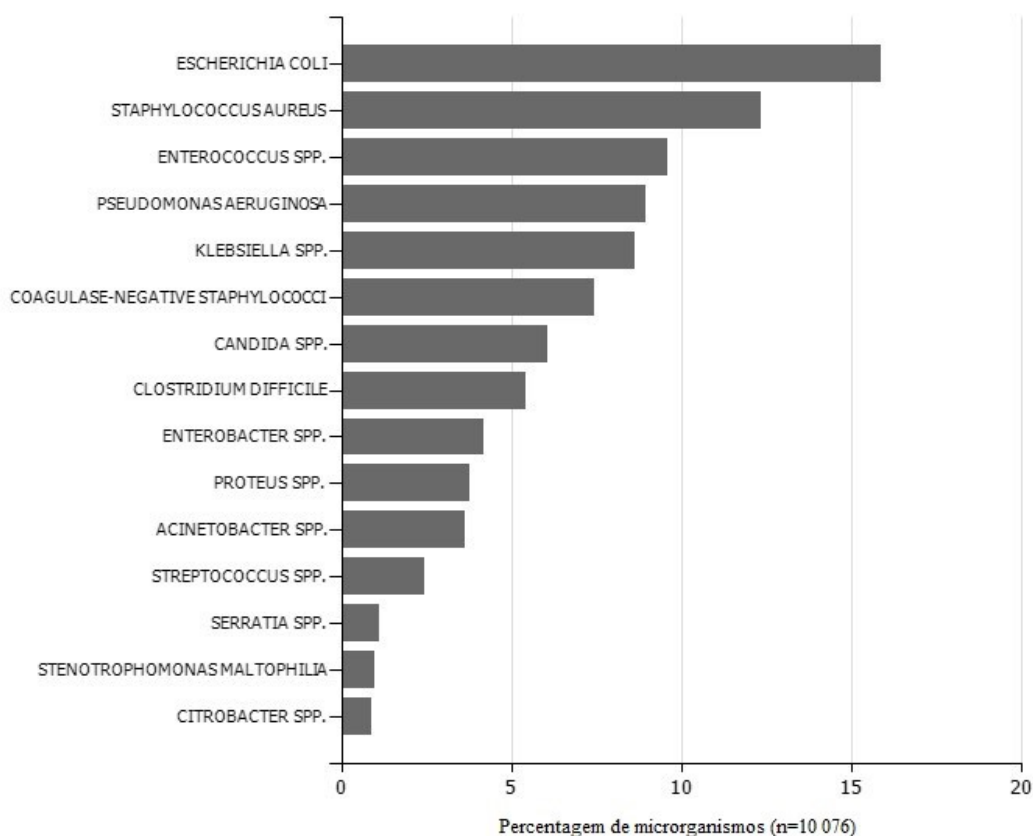


Figura 3. Percentagem de microrganismos mais isolados em hospitais europeus (retirado e adaptado de Zarb et al., 2012).

As bactérias são os microrganismos mais frequentemente implicados nas IACS (Fernandes, 2013). Estes agentes infecciosos podem ser endógenos (fazem parte da flora comensal do indivíduo) ou exógenos (provenientes do meio exterior ao hospedeiro). Os

agentes endógenos causam infecção quando se multiplicam em locais fora do seu habitat natural, devido, por exemplo, a feridas nos tecidos ou devido a terapia antibiótica inapropriada. Os agentes exógenos podem ser provenientes de outros pacientes, de profissionais de saúde ou do meio ambiente (Mourud, 2010). Para além desta classificação, as bactérias podem, também, ser consideradas comensais e patogénicas. As primeiras fazem parte da flora normal do Homem, têm um papel importante na prevenção da colonização por microrganismos patogénicos e não causam infecção no hospedeiro, embora algumas possam ser oportunistas e provocarem infecção em determinadas condições, nomeadamente quando o hospedeiro está imunocomprometido. As bactérias patogénicas causam infecções em humanos independentemente do estado imunológico do hospedeiro, devido ao seu elevado poder patogénico/virulência (Ducel, Fabry, & Nicolle, 2002).

No estudo anteriormente referido (Zarb et al., 2012), realizado na Europa, o local de infecção foi correlacionado com as bactérias mais frequentes enquanto agentes causais: no caso de infecções do local cirúrgico, as bactérias mais isoladas foram cocos Gram positivos, nas infecções do sistema urinário foram Enterobactérias, no trato respiratório foram bactérias Gram negativas não fermentativas, e nas infecções do sistema gastrointestinal, foram bactérias anaeróbias (Zarb et al., 2012).

Os vírus também podem ser responsáveis por IACS, sendo alguns dos mais frequentemente envolvidos, os vírus da hepatite B e C, o vírus sincicial respiratório, rotavírus e enterovírus (Ducel et al., 2002).

Muitos fungos e parasitas são organismos oportunistas que se encontram em instalações associadas a cuidados de saúde, pelo que podem causar infecções no hospedeiro quando este é submetido a tratamentos prolongados com antibióticos ou devido a outros fatores de risco, como por exemplo, imunossupressão severa do hospedeiro (Ducel et al., 2002), quimioterapia, cateteres, hemodialise, neutropenia ou infecção fúngica anterior (Mourud, 2010).

Nos locais onde se prestam cuidados de saúde também podem existir protozoários, entre os quais amibas. Estes agentes microbiológicos podem estar diretamente envolvidos em infecções ou constituir reservatórios para outros microrganismos patogénicos.

As amibas são organismos unicelulares eucariotas, sem parede celular que se movimentam de forma única, estendendo o seu citoplasma na forma de pseudópodes

(Drancourt, 2014), sendo esta a principal característica que as separa dos restantes protozoários (Gockel-Blessing, 2013). Dentro deste grupo de microrganismos, as amibas com maior relevância para o desenvolvimento deste trabalho são as amibas de vida livre (AVL).

O termo “amibas de vida livre” refere-se a um grupo heterogéneo que contém organismos selecionados com base na sua aparência morfológica e comportamental e não na sua relação filogenética, não sendo representante de uma categoria taxonómica (Winiecka-Krusnell & Linder, 2001).

As AVL são amibas não parasitas que completam o seu ciclo de vida no ambiente sem requerer um organismo hospedeiro (Cateau, Delafont, Hechard, & Rodier, 2014). Estas amibas têm pelo menos duas fases de desenvolvimento: o trofozoíto, a forma vegetativa, e o quisto, a forma de repouso (Greub & Raoult, 2004). O trofozoíto corresponde ao período de maior atividade metabólica da amiba, com divisão, alimentação e motilidade, enquanto que o quisto corresponde à fase em que a amiba é metabolicamente menos ativa e pode resistir a condições ambientais hostis, como a falta de nutrientes, stress osmótico, mudanças de temperatura, variações de pH e desinfeção de redes de abastecimento de água (Cateau et al., 2014).

1.1.3. Tipos de IACS e respetivos fatores de risco

Apesar de as IACS poderem atingir qualquer órgão, tecido ou músculo, tal como já foi referido, as mais comuns são as infeções do local cirúrgico, pneumonia, infeções do sistema urinário e infeções do sistema sanguíneo, tanto a nível mundial, como a nível europeu e nacional. Por esta razão, no presente trabalho, serão estas as IACS sucintamente abordadas.

É extremamente importante identificar os fatores de risco associados às IACS, uma vez que o seu conhecimento permite estabelecer estratégias de prevenção. Os fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento de IACS podem ser considerados intrínsecos ou extrínsecos (Emori & Gaynes, 1993).

Os fatores de risco intrínsecos estão relacionados com o doente e com possíveis comorbilidades que este possua, pelo que conhecer com antecedência possíveis doenças do paciente permite observá-lo com maior atenção e estabelecer medidas preventivas

pelos profissionais de saúde, uma vez que um indivíduo com outras doenças associadas fica mais suscetível de adquirir uma IACS (Emori & Gaynes, 1993).

Os fatores de risco extrínsecos estão relacionados com os profissionais de saúde ou com o ambiente hospitalar. De acordo com um estudo (SinghNaz, Sprague, Patel, & Pollack, 1996), quanto maior for o tempo de internamento de um paciente, maior é a probabilidade do mesmo adquirir uma IACS, uma vez que existe a possibilidade de o paciente estar mais tempo exposto a agentes patogénicos. No mesmo estudo, a nutrição parentérica também foi referida como potencial risco de IACS.

Os fatores de risco mais comuns estão associados a dispositivos médicos ou a procedimentos cirúrgicos invasivos (Emori & Gaynes, 1993). A evolução da tecnologia médica veio facilitar o diagnóstico, tratamento e monitorização de doenças. No entanto, alguns destes novos dispositivos aumentam o risco de infeções, devido à possibilidade de serem facilmente contaminados com microrganismos patogénicos.

Para além dos fatores de risco mais frequentemente associados aos diferentes tipos de IACS, que vão ser referidos nos pontos seguintes deste trabalho, atualmente existem outros a emergir, como os telemóveis e outros dispositivos móveis/eletrónicos (Ulger, Dilek, Esen, Sunbul, & Leblebicioglu, 2015). Hoje em dia, muitos profissionais de saúde recorrem a alguns dispositivos móveis para aceder a resultados de laboratório e a dados do doente, os quais permitem monitorizar mais facilmente a história clínica do paciente, algumas vezes sem a presença do mesmo no hospital, mas que, no entanto, funcionam como veículo de microrganismos potencialmente patogénicos que se encontram nas mãos, bolsos, malas e outros objetos pessoais dos profissionais de saúde, pelo que podem estar na origem de IACS.

1.1.3.1. Infeções do local cirúrgico (ILC)

As ILC ocorrem nos locais de incisão, até trinta dias após a cirurgia, ou até um ano caso tenha sido colocado um implante, e são caracterizadas por descarga purulenta à volta da mesma (Fernandes, 2013). As ILC podem ser classificadas consoante o local onde surgem e o que nele afetam e, por outro lado, a ferida cirúrgica pode ser classificada de acordo com o grau de probabilidade da sua contaminação antes e após a cirurgia. Assim, as ILC podem ser superficiais, profundas ou de órgão/espaco, enquanto a ferida cirúrgica

pode ser considerada limpa, limpa/contaminada, contaminada ou suja (Centro Hospitalar de Lisboa Central, 2015).

Uma vez que existem múltiplos fatores de risco associados às ILC, assim como as fontes de contaminação, estas infeções apresentam uma enorme variedade de microrganismos associados (Fernandes, 2013). A maioria dos agentes responsáveis são bactérias pertencentes à flora normal, como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli* (Fernandes, 2013; Goulão, 2014; Mendes, 2013). Mais raramente podem ser causadas por microrganismos menos comuns, como *Rhizopus oryzae*, *Clostridium perfringens*, *Rhodococcus bronchialis*, *Nocardia farcinica*, *Legionella pneumophila*, *Legionella dumoffii* e *Pseudomonas multivorans* (Mangram, Horan, Pearson, Silver, & Jarvis, 1999).

As ILC, normalmente, são adquiridas durante o procedimento clínico e, à semelhança do que acontece com as outras IACS, podem ter origem endógena ou exógena (World Health Organization, 2002). As causas endógenas podem depender de características do paciente, como por exemplo, da idade, infeções pré-existentes, malnutrição, obesidade, diabetes e tabagismo (Mangram et al., 1999; Owens & Stoessel, 2008; Centro Hospitalar de Lisboa Central, 2015). As fontes exógenas podem relacionar-se com as fases (i) pré-operatória, por exemplo, a realização de tricotomia e o vestuário do doente (Centro Hospitalar de Lisboa Central, 2015); (ii) intraoperatória, como o ambiente do bloco operatório ou o material cirúrgico; (iii) ou pós-operatória, como os cuidados da incisão (Ruiz Tovar & Badia, 2014).

1.1.3.2. Pneumonia

A pneumonia nosocomial consiste numa infeção do parênquima pulmonar que surge 48 a 72 horas após a admissão hospitalar. Quando surge entre as 48 e 72 horas designa-se precoce, e quando surge para além das 72 horas designa-se tardia (Cardoso, 2015; Goulão, 2014).

Esta infeção aumenta o período de internamento entre 7 a 9 dias e é a que apresenta maior taxa de mortalidade (Mendes, 2013). É mais frequente em doentes internados na unidade de cuidados intensivos, uma vez que neste tipo de unidade há um maior número de doentes que precisam de ser intubados, em geral com uma idade mais avançada e com

doenças respiratórias associadas e, também, devido à presença de doentes pós-cirúrgicos, que se encontram inconscientes (Fernandes, 2013).

O maior fator de risco para a pneumonia nosocomial é a utilização de ventilador mecânico, pelo que quando este dispositivo está associado à patologia, esta se designa por pneumonia associada ao ventilador (PAV). Os microrganismos associados à PAV precoce são *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza* e *Streptococcus pneumoniae* e são consideradas menos graves e com melhor prognóstico. Por outro lado, a PAV tardia deve-se a microrganismos geralmente mais resistentes a antibióticos, como é o caso de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *Enterobacter* spp., sendo responsáveis por um aumento da morbilidade e da mortalidade (Fernandes, 2013; Goulão, 2014). A maioria dos agentes patogénicos infetam os pulmões após a sua aspiração e são frequentemente endógenos, pois fazem parte da flora do trato digestivo, mas também podem ter origem exógena, nomeadamente a partir do equipamento respiratório (World Health Organization, 2002). Quanto mais cedo a pneumonia for diagnosticada, mais rapidamente se institui a terapêutica mais adequada, pelo que este é um fator crucial para um prognóstico favorável.

1.1.3.3. Infecções do trato urinário (ITU)

As infecções do sistema urinário ocorrem em qualquer local do mesmo, incluindo a uretra, a bexiga, ureteres e rim. Normalmente apresentam menor morbilidade que as restantes IACS, com tratamento mais simples, sem deixar sequelas graves (Fernandes, 2013).

Os principais agentes patogénicos são de origem bacteriana, sendo que a maioria são bactérias que fazem parte da flora humana, tais como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, embora também possam ser adquiridas em meio hospitalar, como a *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp., *Acinetobacter* spp e *Enterococcus* spp (Cardoso, 2015; Fernandes, 2013; Goulão, 2014; World Health Organization, 2002). Por vezes, a *Candida albicans* também está implicada em ITU, sendo o fungo mais prevalente nestas infecções (Mendes, 2013).

As ITU são mais frequentes em mulheres, em doentes geriátricos, nas grávidas e nos diabéticos (Goulão, 2014). Cerca de 75% das ITU devem-se ao uso de cateter urinário. Estas infecções devem-se à formação de um biofilme na superfície do cateter, onde os

microrganismos proliferam e sabe-se que, por cada dia de algaliação, o risco de infecção aumenta entre 3 a 10%, chegando perto dos 100% ao fim de 30 dias (Pina et al., 2010). Visto o cateter ser um fator de risco tão crucial, deve ser colocado apenas quando estritamente necessário e removido assim que possível (Cardoso, 2015).

1.1.3.4. Infecções da corrente sanguínea (ICS)

As ICS surgem, muitas vezes, como consequência de outras infecções, como ITU, ILC e infecção pulmonar (Goulão, 2014).

As ICS estão relacionadas com elevadas taxas de mortalidade dos doentes, já que os microrganismos que as produzem estão presentes na corrente sanguínea e, por isso, atingem rapidamente qualquer local do corpo. As bactérias são os agentes patogénicos mais frequentemente envolvidos, nomeadamente Enterobactérias, bactérias Gram negativo não fermentativas e Gram positivo. O fungo mais frequente é a *Candida* spp. (Pina et al., 2012).

À semelhança do que acontece com as ITU, também estas IACS estão frequentemente associadas à presença de cateteres (Cardoso, 2015; Fernandes, 2013; Goulão, 2014; Mendes, 2013). De facto, apesar do uso destes dispositivos ser uma prática comum, por facilitar o acesso vascular permanente, não está totalmente isento de riscos (Cardoso, 2015).

Nas infecções da corrente sanguínea associadas a cateter, este dispositivo pode ser contaminado de diversas maneiras e por diferentes microrganismos, como por exemplo com os da flora comensal cutânea, que conseguem facilmente invadir o trato percutâneo, através da ação capilar. O cateter pode também ser contaminado pela flora da pele, no seu local de incisão, ou através das mãos, fluídos ou dispositivos contaminados. Por fim, a infecção pode ocorrer devido à existência de um foco de infecção distante (Goulão, 2014; Mendes, 2013).

1.1.4. Prevenção das IACS

As IACS constituem uma ameaça para a saúde a nível hospitalar e de serviços de saúde em geral, bem como para a comunidade. Assim, é fundamental existir uma estratégia preventiva, integrada e interdisciplinar nas organizações de saúde.

Com a prestação de cuidados de saúde, quer os profissionais de saúde quer os doentes, estão suscetíveis a um risco elevado de ocorrência de IACS. Por esta razão, é necessário a existência de ações que atuem tanto na prevenção como no controlo da transmissão cruzada de microrganismos (Aires, 2011; Pina et al., 2010).

Hoje em dia, para além da existência de risco de infeção para o doente, também os profissionais de saúde são um alvo quando os procedimentos de segurança não são cumpridos. Deste modo, surge o termo “precauções básicas e de isolamento” que corresponde ao conjunto de medidas aplicadas a todos os doentes, independentemente do diagnóstico, e sempre que ocorra o contato com secreções, sangue, fluídos orgânicos, pele não íntegra ou mucosas e manipulação de material contaminado (Pina et al., 2010). As precauções básicas são a primeira barreira de segurança nos cuidados de saúde evitando a transmissão cruzada de IACS e assim a segurança dos doentes (Aires, 2011).

O controlo de infeção surge como o primeiro princípio fundamental para erradicar a ocorrência de IACS, estando bastante fundamentado quanto às metodologias de prevenção, quer por meio de estudos científicos e programas de vigilância, quer pela divulgação de recomendações e publicações de circulares normativas. Os cuidados de saúde, para além de serem prestados nos hospitais, começaram a surgir noutras instituições de saúde (cuidados continuados, ambulatório, cuidados domiciliários, etc.) o que acarretou que os princípios de controlo de infeção fossem adaptados a cada local de acordo com as suas necessidades específicas. Os principais princípios de controlo de infeção consistem na identificação e controlo do foco infeccioso, na obtenção de amostras para exame microbiológico e num rápido início de terapêutica (Aires, 2011).

De referir que fatores como a sobrelotação, a ausência de pessoal dedicado apenas aos doentes infetados, transferências frequentes de doentes entre serviços e instituições de saúde, e doentes críticos internados em unidades específicas, contribuem para o aumento de IACS (Aires, 2011).

Sabe-se já desde os anos oitenta, que o veículo para a transmissão de microrganismos da pele do doente para as mucosas ou para locais do corpo estéreis (sangue, líquido pleural, etc.) passa pelas mãos dos profissionais de saúde. Deste modo, a higiene das mãos e o uso de equipamento de proteção individual, integrados no conjunto das precauções básicas, constituem as medidas mais recomendadas tanto para proteger tanto os profissionais de saúde, como os doentes (Aires, 2011; Pina et al., 2010).

Visto isto, nas principais medidas de prevenção das IACS incluem-se a higienização das mãos, a utilização de equipamento de proteção individual, higiene do ambiente, entre outros (Aires, 2011; Pina et al., 2010).

A importância da higiene das mãos na prevenção de IACS é baseada na capacidade da pele alojar microrganismos e transferi-los por contacto direto, pele com pele, ou indireto, através de objetos (Monteiro, 2012). Esta prática constitui uma ação simples, sendo importante o uso de produtos específicos (solução antisséptica de base alcoólica) para realizar a devida inativação do crescimento de microrganismos (Monteiro, 2012).

A utilização de equipamento de proteção individual tem por objetivos proteger a pele/corpo e prevenir a contaminação da roupa, durante a prestação de cuidados diretos ao doente, e proteger os doentes da libertação potencial de microrganismos (Pina et al., 2010).

As precauções de isolamento de doentes com infeção suspeita ou confirmada baseiam-se no modo de transmissão, por contato, por gotículas ou por via aérea. As precauções de contato aplicam-se quando se verificam situações, como a presença de abscessos em drenagens, feridas abertas e incontinência fecal, que sugerem um aumento potencial de grande contaminação ambiental e risco de transmissão. As precauções de isolamento por gotículas, libertadas pela tosse, espirro ou através de contato da mucosa com secreções respiratórias, requerem que o doente tenha um quarto individual com a particularidade de estar equipado com pressão negativa, mantendo sempre as portas fechadas, e utilização de máscaras por parte dos profissionais de saúde e das visitas (Pina et al., 2010)

Em suma, parece muito simples prevenir, mas é bastante complexo pela quantidade de variáveis e fatores em causa. Assim, é importante fazer formação adequada aos profissionais de saúde, de modo a que estes assumam o compromisso de alertar os doentes, visitas, fornecedores e voluntários para a importância desta prática (Almeida, 2014; Tender, n.d.). Por outro lado, é necessário ter em conta que, apesar de se implementarem medidas preventivas, existem microrganismos que podem permanecer no meio ambiente, tal como é o caso das amibas que não são destruídas por desinfetantes normalmente usados nos serviços de saúde e que, adicionalmente, podem ser reservatórios para outros microrganismos. Estes aspetos podem constituir um parâmetro a ser repensado nos planos de prevenção.

1.1.5. Custo associado às IACS

As IACS constituem um problema de saúde que acarreta vários custos para qualquer sistema de saúde de um país, uma vez que aumentam a morbilidade, mortalidade e duração de hospitalização de um doente. Como já foi referido, a nível mundial estima-se que, todos os dias, cerca de 1,4 milhões de doentes adquirem infeções nos hospitais sendo, por isso, fundamental, para reduzir o impacto deste problema, efetuar uma avaliação económica de forma precisa dos custos (Aires, 2011; Cardoso, 2015).

O custo associado às IACS é um dado complexo que compreende os custos diretos, os custos indiretos, os custos fixos e os custos intangíveis (Aires, 2011; Cardoso, 2015).

Os custos diretos são o dispêndio monetário que se aplica diretamente na produção de um serviço, como por exemplo, o custo com a medicação e os meios complementares de diagnóstico (Aires, 2011; Almeida, 2014).

Os custos indiretos são relativos a diversos procedimentos ou serviços e a sua distribuição é proporcional ao volume de produção. Exemplos de custos indiretos passam pelos gastos relativos à água, luz e limpeza (Aires, 2011; Almeida, 2014).

Os custos fixos são os custos que se mantêm constantes mesmo havendo alterações nos números de atendimentos, ou seja, são os salários e as despesas com as infraestruturas instaladas (Aires, 2011).

Os custos intangíveis são os custos relacionados com o volume de produção, que podem aumentar ou diminuir de acordo com o número de atendimentos, e com as alterações afetivas, emocionais, psicológicas, dor, sofrimento, isolamento, perda da produtividade e diminuição da qualidade de vida. São os custos mais difíceis de quantificar pois dependem unicamente da perceção que o doente tem sobre os seus problemas de saúde (Aires, 2011; Almeida, 2014).

Para além de todos os custos mencionados, existem ainda os custos que atingem a sociedade, isto é o afastamento provisório ou definitivo (sequelas ou morte) do exercício profissional, os custos com indemnizações ao doente ou família e as sanções pelos órgãos de classe (Aires, 2011).

Num estudo realizado no Centro Hospitalar da Cova da Beira, foi avaliado o custo das infeções hospitalares em doentes admitidos em algumas especialidades de internamento. Verificou-se que os doentes com infeção apresentavam um custo médio dos dias de

internamento de 8645,54 euros enquanto os doentes sem infeção apresentavam um custo médio dos dias de internamento de 3857,93 euros. Com este estudo, concluiu-se que a média total de custos da duração do internamento que ocorrem em doentes com infeção hospitalar é superior aos custos ocorridos em doentes sem infeção hospitalar (Cardoso, 2015).

De acordo com o descrito anteriormente, entende-se que o custo económico relacionado com as infeções se traduz num aumento da demora média de hospitalização, no aumento da utilização de antibióticos e no recurso a dispositivos médicos (Aires, 2011).

A dotação de serviços com mais e melhores recursos e a diminuição do tempo de permanência dos doentes nos serviços são importantes fatores que se devem considerar também nas medidas de prevenção das IACS (Aires, 2011; Almeida, 2014).

CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO

Nos ambientes naturais é possível observar a formação de comunidades biológicas complexas entre os mais diversos microrganismos, onde o equilíbrio entre as populações de diferentes espécies depende das relações que estas mantêm entre si. Essas relações podem ser de rivalidade (quando competem pelas mesmas fontes alimentares, por espaço, ou quando uma é predadora da outra), mas também de apoio e colaboração (nos casos de forécia, associações mutualistas, simbiose) (Rey, 1992).

A competição por nutrientes e outros recursos limitantes constitui um fator seletivo, que leva a adaptações por parte dos microrganismos patogénicos, que lhes permite a sua manutenção no ambiente. No entanto, para garantir a sua sobrevivência, também necessitam de evitar, tolerar e defender-se de predadores naturais (Matz & Kjelleberg, 2005). Alguns agentes patogénicos bacterianos intracelulares desenvolveram estratégias que lhes permitem utilizar os recursos das células hospedeiras e replicar dentro das mesmas sem serem detetadas pelo seu sistema imunitário (Hagedorn, Rohde, Russell, & Soldati, 2009).

O facto de alguns agentes patogénicos poderem permanecer no interior de células hospedeiras sem ocorrer a sua destruição, também pode contribuir para a sua sobrevivência e permanência no meio ambiente, tal como acontece para microrganismos resistentes às AVL.

As AVL são ubiqüitárias e têm sido isoladas não só de fontes naturais, como o solo, a água doce e salgada, o pó e o ar, mas também de ecossistemas antropogénicos, como a água da torneira, unidades de ar condicionado e torres de arrefecimento (Molmeret, Bitar, Han, & Kwaik, 2004). A sua abundância e diversidade no ambiente varia consoante a estação, a temperatura, a humidade, o pH e os nutrientes disponíveis (Greub & Raoult, 2004). São seres móveis e alimentam-se de bactérias, algas, fungos, protozoários ou outras partículas orgânicas. No solo, as AVL são mais abundantes em plantas, uma vez que estas permitem o crescimento de uma variedade de microrganismos dos quais as amibas se alimentam. Na água, as espécies que exibem um estágio flagelar conseguem nadar e as restantes aderem a biofilmes para obter alimento (Greub & Raoult, 2004).

Um biofilme natural consiste numa comunidade de diferentes microrganismos retidos numa matriz polimérica extracelular ligada a uma superfície (Cateau et al., 2014). As AVL ocorrem frequentemente em biofilmes, sendo estes de grande importância no

crescimento e na sobrevivência de microrganismos em ambientes naturais e artificiais, uma vez que podem representar um habitat para seres patogénicos (Cateau et al., 2014).

As AVL eram consideradas habitantes inofensivos de ambientes aquáticos e terrestres (Winiecka-Krusnell & Linder, 2001) mas, nas últimas décadas, o interesse pelo seu estudo cresceu como resultado da demonstração da patogenicidade de algumas espécies, assim como do seu papel como reservatório para diversos microrganismos resistentes às amibas (bactérias, fungos, etc.) (Greub & Raoult, 2004).

2.1. Infeções causadas por AVL

As infeções por AVL constituem doenças emergentes que ganharam bastante relevo recentemente. A morfologia polimórfica das AVL permite-lhes adaptarem-se a uma variedade de condições ambientais, podendo ser isoladas de diversas fontes a nível mundial. Diversas espécies podem causar doenças rapidamente fatais (Trabelsi et al., 2012).

Os três géneros de AVL que podem estar diretamente envolvidos em doenças humanas são *Acanthamoeba* spp., *Naegleria* spp., *Balamuthia* spp. (Cateau et al., 2014). As principais características destas doenças vão ser descritas nos pontos seguintes.

2.1.1. *Acanthamoeba* spp.

De todas as amibas, *Acanthamoeba* é a mais comum, sendo ubiqüitária e com distribuição mundial na natureza (Trabelsi et al., 2012).

Tal como a maioria das amibas, apresenta duas formas morfológicas, o trofozoíto e o quisto. O trofozoíto alimenta-se de bactérias e outras partículas que se encontrem à sua volta e, quando as condições de crescimento são desvantajosas, transforma-se num resistente quisto, forma que mantém até que o ambiente se torne novamente favorável (Visvesvara, Moura, & Schuster, 2007).

Podem ser isoladas de uma variedade de locais na natureza, incluindo água do mar, areia da praia, esgotos, solo; em ambientes domésticos, como aquários, humidificadores, torneiras, lavatórios; e em ambientes hospitalares, como chuveiros, ventiladores, banheiras de hidroterapia e unidades de ar condicionado (Trabelsi et al., 2012; Visvesvara et al., 2007). São organismos bastante resistentes, que conseguem sobreviver numa ampla

variedade de condições de temperatura, salinidade e pH. As espécies que provocam infecções em humanos têm de conseguir sobreviver a 37°C e temperaturas ligeiramente superiores (Schuster & Visvesvara, 2004a).

Acanthamoeba spp. pode causar infecções sistêmicas oportunistas em humanos, como encefalite granulomatosa amebiana (EGA) e infecções cutâneas e nasofaríngeas, e infecções não oportunistas, como queratite por *Acanthamoeba* (QA) (figura 4) (Trabelsi et al., 2012).

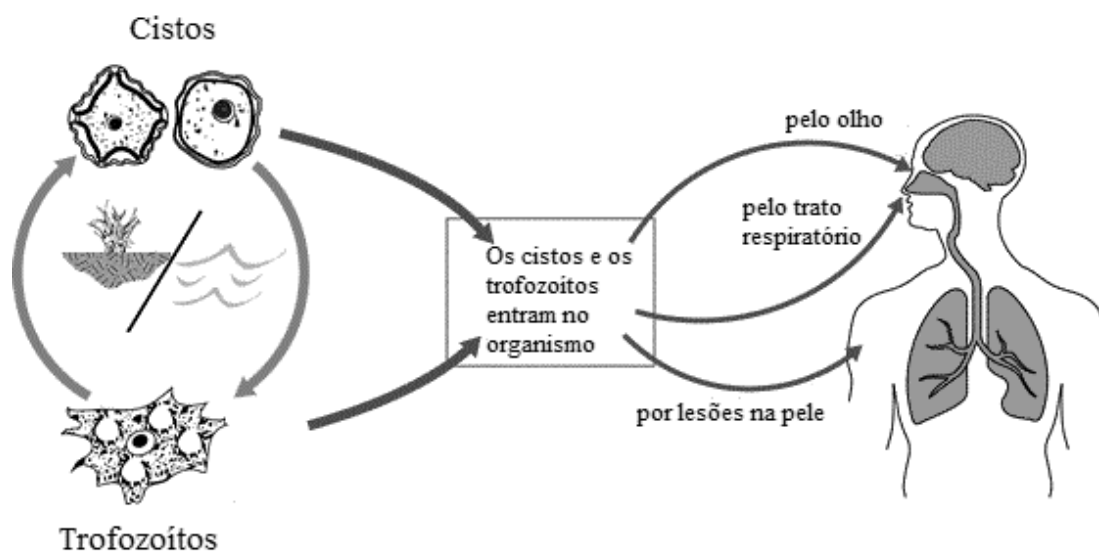


Figura 4. Ciclo de vida e portas de entrada de *Acanthamoeba* (retirado e adaptado de “*Acanthamoeba* biology,” 2012).

No caso da QA, como não se trata de uma infecção oportunista, não terá grande relevo para este trabalho, uma vez que as IACS são normalmente deste tipo. Trata-se de uma infecção rara, que ocorre em indivíduos saudáveis que sofreram trauma da córnea ou que utilizam lentes de contacto, pelo que é importante educar os utilizadores de lentes para a importância da correta manipulação das mesmas. Caso não seja tratada, pode causar perda de acuidade visual, ulceração da córnea e, eventualmente, cegueira (Seal, 2003). Como esta doença é causada pelo resistente quisto de *Acanthamoeba*, existe alguma dificuldade em tratá-la, devido à existência de resistências (Trabelsi et al., 2012). Alguns fármacos eficazes incluem clorhexidina, neomicina, paromicina, clotrimazol e itraconazol (Schuster & Visvesvara, 2004b). Também podem ser utilizados esteroides tópicos para aliviar a dor e a inflamação (Schuster & Visvesvara, 2004a).

A EGA ocorre, normalmente, em indivíduos imunocomprometidos, pelo que não está relacionada com uma época específica do ano (Trabelsi et al., 2012). Esta doença desenvolve-se lentamente após entrada do agente patogénico pelo sistema respiratório ou por lesões cutâneas, e a partir desses locais é guiado até ao sistema nervoso central (SNC), através da corrente sanguínea (Martinez, 1991). Como é uma doença que é difícil de reconhecer e evolui rapidamente para a morte, é provável que tenham existido mais casos que os relatados e que eventualmente tenham sido mal diagnosticados (Trabelsi et al., 2012). Os sintomas incluem cefaleia, rigidez do pescoço, alterações mentais, náuseas, vómitos, febre, letargia, ataxia, distúrbios visuais e hemiparesia, podendo conduzir a coma (Visvesvara et al., 2007) e morte (Trabelsi et al., 2012). O tratamento desta doença é dificultado pela falta de sintomas claros e testes de diagnóstico fiáveis. Alguns fármacos eficazes contra a EGA incluem cetoconazol, sulfadiazina, fluconazol, anfotericina B, azitromicina, itraconazol e rifampicina. No entanto, esta doença é quase sempre fatal (Trabelsi et al., 2012).

Uma vez que a EGA causada por *Acanthamoeba* spp. ocorre em hospedeiros com o sistema imune debilitado, não existem métodos para prevenção desta infeção (Visvesvara et al., 2007).

Acanthamoeba também pode causar amebíase cutânea, uma infeção rara, que ocorre em doentes imunocomprometidos. Os locais do corpo mais afetados são a face, o tronco e as extremidades, onde podem surgir nódulos, pústulas, pápulas ou ulcerações. Caso haja envolvimento do SNC, o doente pode morrer em poucas semanas. O tratamento tópico pode ser feito com clorhexidina e cetoconazol em adição a pentamidina, cetoconazol, sulfadiazina, flucitosina, fluconazol ou itraconazol (Trabelsi et al., 2012). Esta infeção pode evoluir para EGA, caso a amiba chegue ao SNC através do sistema sanguíneo (Schuster & Visvesvara, 2004a)

2.1.2. *Balamuthia mandrillaris*

Dentro do género *Balamuthia*, *B. mandrillaris* é a única espécie que causa infeções em humanos e animais (Matin, Siddiqui, Jayasekera, & Khan, 2008). Esta AVL também causa EGA, semelhante à que ocorre por *Acanthamoeba*, ocorrendo maioritariamente em indivíduos imunocomprometidos (Visvesvara et al., 2007). No entanto, em anos mais

recentes, também têm havido relatos de infecção em crianças saudáveis (Schuster & Visvesvara, 2004a).

Balamuthia mandrillaris alimenta-se de AVL mais pequenas (Visvesvara et al., 2007). À semelhança da ameba anteriormente descrita, tem dois estados morfológicos, de trofozoíto e de quisto, que se podem alojar no cérebro, olhos, pele e pulmões (Trabelsi et al., 2012). Não é uma AVL tão ubiqüitária quanto *Acanthamoeba*, encontra-se no solo e é difícil de isolar e cultivar (Dunnebacke, Schuster, Yagi, & Booton, 2004). A porta de entrada pode ser através do trato respiratório inferior, pela inalação de quistos, ou através de lesões na pele, devido a solo contaminado (figura 5) (Bakardjiev et al., 2003).

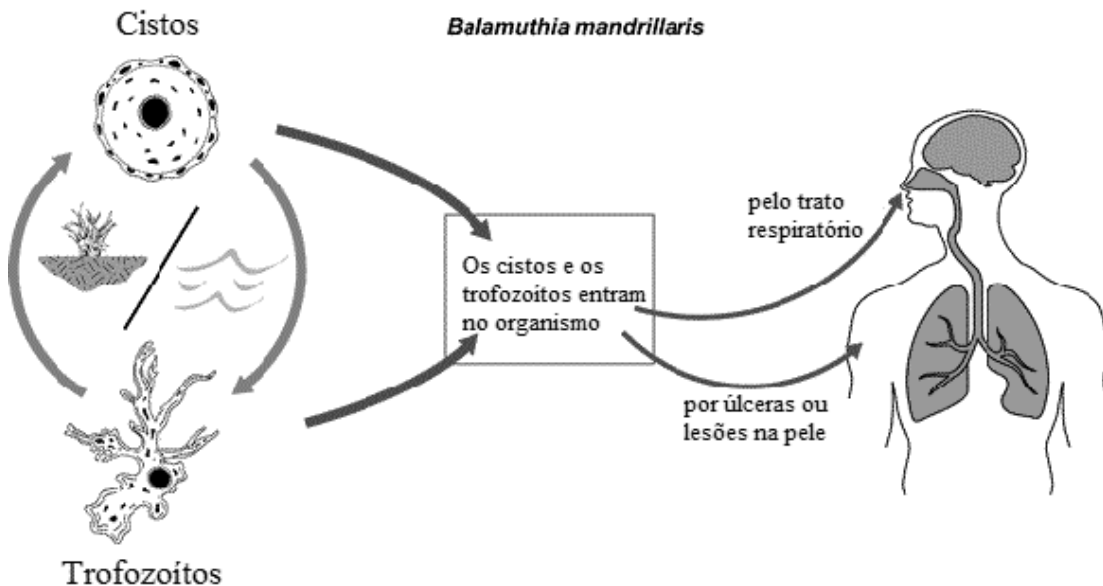


Figura 5. Ciclo de vida e portas de entrada de *Balamuthia mandrillaris* (retirado e adaptado de “Pathogen & Environment of *Balamuthia mandrillaris*,” 2016).

Os principais sintomas da EGA por *Balamuthia* incluem cefaleia, fotofobia, náuseas, vômitos, febre, mialgias, perda de peso e convulsões (Visvesvara et al., 2007), alterações de personalidade, rigidez do pescoço, hemiparesia e afasia (Schuster & Visvesvara, 2004a).

A EGA por *B. mandrillaris* pode ser tratada com uma combinação de pentamidina, isetionato, sulfadiazina, claritromicina, fluconazol e flucitosina (Schuster & Visvesvara, 2004a; Trabelsi et al., 2012).

2.1.3. *Naegleria fowleri*

Naegleria fowleri é o agente causal de meningoencefalite primária amebiana (MPA) em indivíduos saudáveis e imunocompetentes (Schuster & Visvesvara, 2004a; Trabelsi et al., 2012).

Para além do estado de trofozoíto e de quisto, *N. fowleri* ainda possui uma forma flagelar. O trofozoíto é a forma ativa, que muda constantemente o seu tamanho e forma, e alimenta-se de bactérias e matéria orgânica. Quando as condições ambientais são desfavoráveis enquista, mas forma um quisto menos resistente que o de *Acanthamoeba* (Visvesvara et al., 2007) pelo que é sensível à seca e a valores de pH extremos (Trabelsi et al., 2012). A sua forma flagelar permite a sua dispersão pelo seu habitat natural (Schuster & Visvesvara, 2004a).

Esta AVL encontra-se no solo e na água, mas não é tão ubiqüitária quanto *Acanthamoeba* (Schuster & Visvesvara, 2004a). É termófila, conseguindo sobreviver a temperaturas até aos 45°C, e pode ser isolada de lagos, piscinas, esgotos, rios e canais de irrigação (Trabelsi et al., 2012; Ugonabo & Gugnani, 1989). Por este motivo, a infeção que provoca ocorre tipicamente no verão, durante atividades recreativas aquáticas (Trabelsi et al., 2012). Também foi isolada da mucosa de crianças assintomáticas e de pacientes saudáveis (Schuster & Visvesvara, 2004a), pelo que não é considerado um organismo oportunista, mas sim patogénico (Visvesvara et al., 2007), que utiliza a mucosa nasal como porta de entrada no Homem (figura 6) (“Free living amebic infections,” 2013).

A MPA é uma infeção com um período de incubação de 1 a 2 dias e que progride rapidamente para morte. Os sintomas incluem cefaleia, náuseas, febre, anormalidades comportamentais, rigidez da nuca (Trabelsi et al., 2012) e, mais tarde, fotofobia, letargia, convulsões, coma, diplopia e morte (Visvesvara et al., 2007).

As percentagens de indivíduos com anticorpos para este microrganismo patogénico variam entre 1 a 4%, pelo que é provável que não exista uma forma assintomática da doença, uma vez que os humanos estão bastante expostos a *Naegleria fowleri* (Schuster & Visvesvara, 2004a).

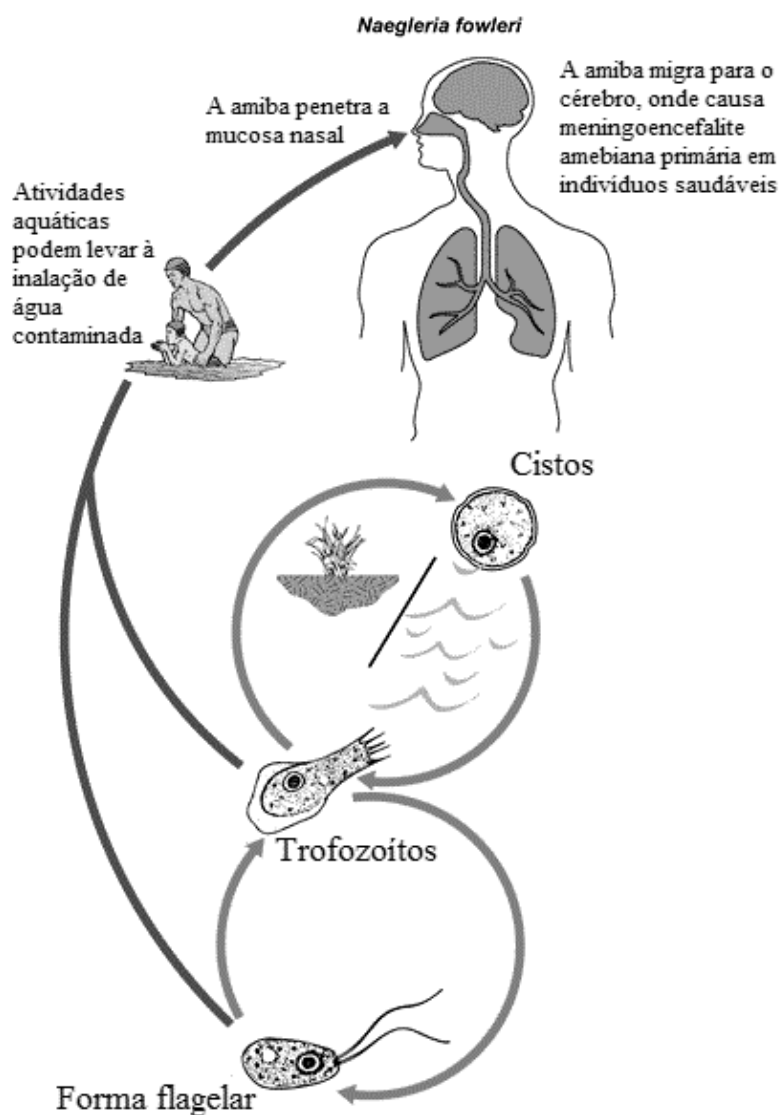


Figura 6. Ciclo de vida e portas de entrada de *Naegleria fowleri* (retirado e adaptado de “Free living amebic infections,” 2013).

O fármaco de eleição para tratar a MPA por *Naegleria fowleri* é a anfotericina B, devido à sua elevada suscetibilidade a este composto (Schuster & Visvesvara, 2004a; Trabelsi et al., 2012; Visvesvara et al., 2007)

2.2. AVL como reservatório para bactérias patogénicas

Tem sido reportado que as AVL podem proteger bactérias de tratamentos de desinfecção de água, particularmente quando protegidas dentro de quistos, que garantem uma barreira física contra métodos de desinfecção (Cateau et al., 2014). Algumas das bactérias com reportada associação a amibas incluem *Legionella pneumophila*,

Mycobacterium spp., *Campylobacter jejuni*, entre outras. Como a maioria destas bactérias são patogénicas humanas, as amibas, ao atuarem como os seus reservatórios ambientais, são consideradas “cavalos de Troia” do mundo microbiano (Molmeret, Horn, Wagner, & Santic, 2005).

2.2.1. *Legionella* spp. como simbiontes facultativos das AVL

Em 1976, durante a convenção da Legião Americana, que se realizou no hotel Bellevue-Stratford, em Filadélfia, 221 participantes ficaram doentes, dos quais 34 faleceram (Janda, 2010). Os afetados apresentaram sintomas de pneumonia, cujo agente infeccioso se revelou, mais tarde, ser a bactéria *Legionella pneumophila*, membro da família Legionellaceae (Bartram, 2007). Hoje em dia, o termo “legionelose” descreve estas infeções bacterianas (tabela 2), cujos sintomas podem variar entre febre moderada – febre Pontiac – e uma rápida e fatal pneumonia – doença dos Legionários (Bartram, 2007).

2.2.1.1. Taxonomia da *L. pneumophila*

L. pneumophila é um bacilo Gram negativo intracelular facultativo, que pode infetar, multiplicar-se dentro de, e matar células hospedeiras eucarióticas, como protozoários e macrófagos de mamíferos (Moliner, Fournier, & Raoult, 2010; Molmeret et al., 2005). A espécie *L. pneumophila* foi a primeira espécie de *Legionella* a ser descrita, sendo a principal causa de doença dos Legionários, mas o número de espécies, subespécies e serogrupos da família Legionellae continua a aumentar (Bartram, 2007). As espécies clinicamente relevantes incluem *L. bozemanii*, *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. anisa*, *L. feeleyi* e *L. longbeachae* (Janda, 2010). No entanto, *L. pneumophila* e *L. longbeachae* são os principais agentes causadores de doença dos Legionários, sendo a primeira responsável por 90% dos casos na Europa e nos Estados Unidos, e a segunda por cerca de 5% dos casos na Austrália e na Nova Zelândia (Wood, Newton, Latomanski, & Newton, 2015).

2.2.1.2. Patogénicos amebianos semelhantes à *Legionella* (PASL)

Em adição às espécies de *Legionella* que já foram descritas e estudadas, existem outras que, apesar de muito semelhantes, não conseguem crescer em meios de crescimento

bacteriológico. Estas bactérias, designadas por patogénicos amebianos semelhantes à *Legionella* (PASL), crescem apenas em meios em que lhes são adicionados protozoários (Molmeret et al., 2005; Richards, Von Dwingelo, Price, & Abu Kwaik, 2013). As PASL são parasitas obrigatórios das amibas, têm a capacidade para as infetar e replicar-se no seu interior. À semelhança do que acontece com a *Legionella*, têm um importante papel em certas doenças, como a Doença dos Legionários (Janda, 2010; Moliner et al., 2010; Molmeret et al., 2005; Richards et al., 2013).

A descoberta destas espécies, cujo crescimento depende da presença de parasitas protozoários, acentua o facto de as amibas poderem constituir um importante vetor para o transporte e replicação de microrganismos patogénicos humanos.

2.2.1.3. Ciclo de vida da *L. pneumophila*

A *L. pneumophila* tem um ciclo de vida bifásico, consoante a disponibilidade de nutrientes (Wood et al., 2015). A fase replicativa é caracterizada por rápida replicação e expressão de traços de virulência, ocorrendo num meio rico em nutrientes. Na ausência de nutrientes, a bactéria entra na fase transmissiva, na qual é bastante móvel e resistente a fatores de stress, libertando fatores que lisam a célula hospedeira e permitem à bactéria procurar um novo nicho intracelular (Cateau et al., 2014; Greub & Raoult, 2004; Wood et al., 2015).

A *L. pneumophila* e amibas são frequentemente isoladas das mesmas fontes de infeção e verificou-se que as amibas suportam a replicação intracelular desta bactéria (Richards et al., 2013). O ciclo de vida de *L. pneumophila* dentro dos macrófagos é semelhante ao que ocorre dentro das amibas (figura 7), observando-se estratégias idênticas para a aderência, a entrada, a saída e a replicação em ambos os tipos de células (Greub & Raoult, 2004).

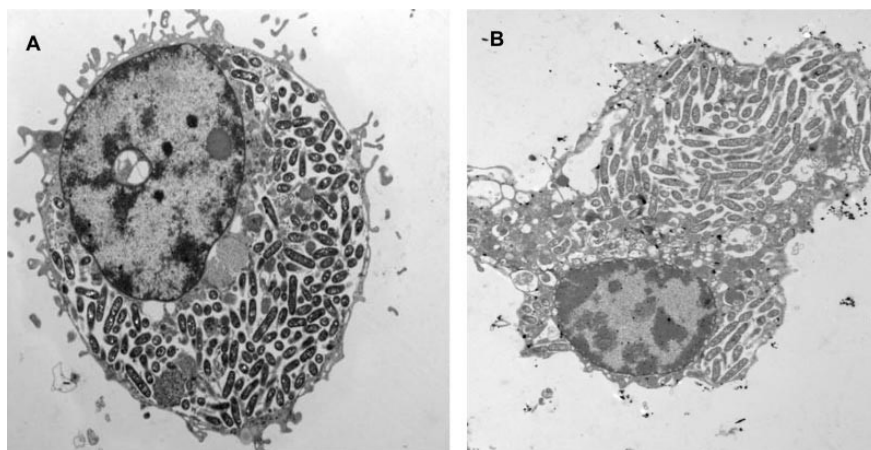


Figura 7. A infecção por *L. pneumophila* é muito semelhante em macrófagos (A) e em amibas (B) (retirado de Molmeret et al., 2005).

As AVL oferecem proteção a *L. pneumophila* aos biocidas e stress ambiental e têm sido descritas como “centros de treino” para bactérias patogénicas, visto estas bactérias usarem mecanismos semelhantes para resistir à fagocitose pelas AVL e pelos macrófagos (Cateau et al., 2014). Assim, a *L. pneumophila* que cresce dentro de amibas aumenta a sua resistência a condições ambientais adversas, como a flutuação de temperatura, a osmolaridade, o pH e a exposição a agentes oxidantes, quando em comparação a bactérias cultivadas *in vitro*, tornando-se esta associação entre *Legionella* e protozoários um fator *major* na presença contínua destas bactérias no ambiente (Molmeret et al., 2005).

2.2.1.4. Transmissão da *L. pneumophila*

Esta bactéria atinge os pulmões após a inalação de gotas de aerossóis contaminados, sendo os sistemas de água quente e ar condicionado as maiores fontes de infecção, uma vez que é ubiqüitária em meios aquáticos. No entanto, também tem sido isolada de fontes, spas, piscinas, unidades hospitalares e dentárias e outros sistemas de água antropogénicos.

A *L. pneumophila* multiplica-se dentro dos macrófagos humanos e por essa razão não se verificam relatos de transmissão entre humanos (Bartram, 2007; Molmeret et al., 2005). A habilidade da *L. pneumophila* parasitar os macrófagos e causar doença em humanos deve-se à sua progressiva adaptação de crescimento intracelular em hospedeiros protozoários, durante a qual adquiriu genes eucariotas (Richards et al., 2013).

Rowbotham (1980) sugeriu a associação das amibas à propagação e distribuição de *Legionella* spp. em meios aquáticos e à transmissão destas bactérias a humanos, funcionando como reservatórios naturais importantes. Acredita-se, também, que as AVL são os principais nichos de replicação daquelas bactérias e que as internalizam por um processo semelhante ao que ocorre nos macrófagos (Cateau et al., 2014).

2.2.1.5. Fatores de virulência da *L. pneumophila*

Os seres humanos são infectados pela inalação de uma vesícula ou ameba que contém a bactéria, e não pela sua forma livre. Após a entrada da *L. pneumophila* na célula hospedeira, como por exemplo macrófagos humanos ou AVL, ela permanece dentro de um vacúolo, “vacúolo contendo *Legionella*” (VCL) (Cateau et al., 2014; Isberg, O’Connor, & Heidtman, 2009). O VCL recruta organitos da célula hospedeira que o fazem passar por retículo endoplasmático (RE) endógeno (figura 8), o que impede a sua fusão com o lisossoma e consequente formação do fagolisossoma (Isberg et al., 2009; Molmeret et al., 2005; Richards et al., 2013; Wood et al., 2015; Zhao, Li, Zeng, & Lu, 2016).

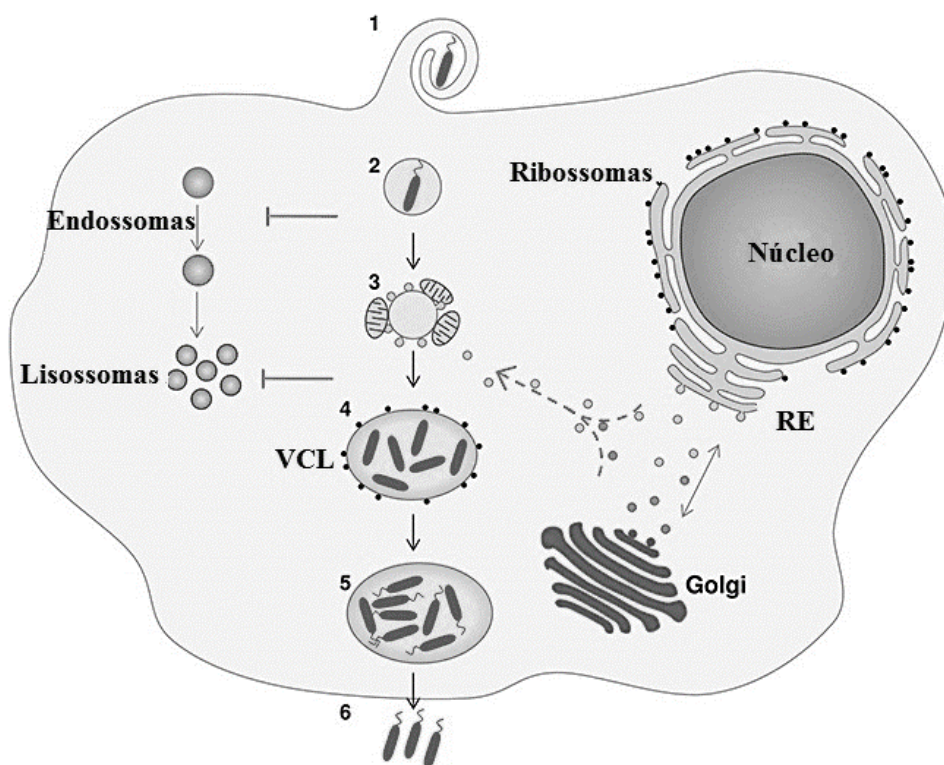


Figura 8. Ciclo de vida intracelular da *L. pneumophila* (retirado e adaptado de Franco, Shuman, & Charpentier, 2009).

Este processo têm início muito rapidamente, logo nos primeiros 15 minutos após a infecção (Molmeret et al., 2004). Uma vez no VCL, a bactéria sobrevive e replica-se em grande quantidade. Estes vacúolos podem abrigar no seu interior até 10^4 bactérias (Greub & Raoult, 2004). Ao fim de algum tempo, a bactéria escapa para o citoplasma da célula hospedeira, onde completa os últimos ciclos de proliferação, assim como modulações fenotípicas, em resposta à depleção de nutrientes (Richards et al., 2013).

Molmeret et al., (2004) estudaram a disrupção da membrana fagossomal do VCL, tendo observado que, às 8 horas após a infecção ainda se encontrava intacta (figura 9), ocorrendo a sua rutura apenas após 12 horas de infecção, pelo que ao fim de 18 a 24 horas, quase todas as células infetadas apresentavam a bactéria no seu citoplasma. Estando no citoplasma, a bactéria tem capacidade para conduzir à formação de um poro na membrana da célula hospedeira para permitir a sua evasão (Molmeret et al., 2004).

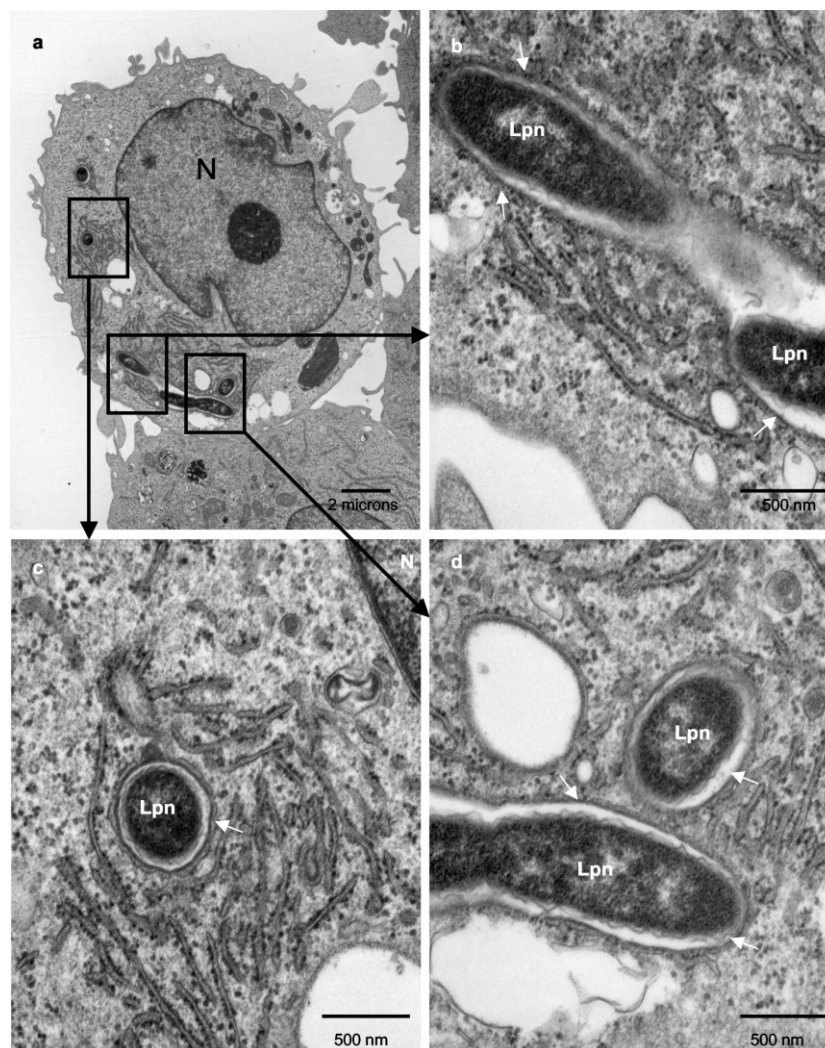


Figura 9. Células infetadas por *L. pneumophila*. Após 8 horas de infecção, o VCL ainda se encontra intacto. Abreviaturas: Lpn, *L. pneumophila*; N, núcleo (retirado de Molmeret et al., 2004).

2.2.2. *Mycobacterium* spp. como simbiontes facultativos das AVL

As micobactérias são o único género pertencente à família Mycobacteriaceae. São bactérias aeróbias, não móveis, não capsuladas e não formadoras de esporos. Normalmente apresentam morfologia bacilar ou cocobacilar, podendo apresentar-se isolados, aos pares ou em pequenos agrupamentos (W. Ferreira & Sousa, 2000).

As micobactérias apresentam coloração Gram variável, tendencialmente positiva. Estes bacilos também podem ser designados por álcool-ácido resistentes, uma vez que depois de serem corados, não é possível descolorá-los com soluções ácidas (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2015).

As micobactérias ainda constituem elevada causa de morbilidade e mortalidade, sendo que as que originam a maioria das infeções em humanos são *M. tuberculosis*, *M. leprae*, o complexo *M. avium*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus* (Murray et al., 2015).

2.2.2.1. Taxonomia de *Mycobacterium* spp.

Atualmente estão descritas 126 espécies de *Mycobacterium*, que se subdividem funcionalmente nas espécies que causam tuberculose, constituindo o complexo *M. tuberculosis*, e um segundo grupo de espécies designadas micobactérias não tuberculosas (MNT). Este último grupo das MNT é constituído por mais de 100 espécies, e a sua classificação é influenciada por diversos fatores, como, por exemplo, o tempo de crescimento e a presença/ausência de pigmentação (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014). O estudo mais aprofundado das MNT surgiu com a diminuição da incidência de tuberculose, onde se demonstrou o papel patogénico destas micobactérias em humanos e em animais (Falkinham III, 1996).

A maioria das micobactérias identificadas existe na natureza ou faz parte da flora comensal do Homem, não provocando doença. Algumas destas bactérias são patogénicas estritas, causando sempre doença. Intermediamente, existe um grupo de micobactérias que causam doença apenas sob certas circunstâncias, nomeadamente em hospedeiros imunocomprometidos (Barroso et al., 2014). Assim, as micobactérias dividem-se em três grupos, consoante a sua patogenicidade. O primeiro grupo é constituído apenas por patogénicos estritos, como *M. tuberculosis* ou *M. leprae*. Ao segundo grupo pertencem as micobactérias normalmente saprófitas, mas que em certas circunstâncias podem causar doença, designando-se micobactérias potencialmente patogénicas ou oportunistas.

Finalmente, o terceiro grupo é formado pelas espécies saprófitas que não são patogénicas (W. Ferreira & Sousa, 2000).

2.2.2.2. Ecologia de *Mycobacterium* spp.

As espécies de *Mycobacterium* crescem lentamente e não crescem nos meios habituais de cultura, tendo exigências nutritivas próprias. Um dos meios mais utilizados para a sua cultura é o meio de Lowenstein-Jensen (W. Ferreira & Sousa, 2000).

As micobactérias são bactérias ubiqüitárias, podendo ser isoladas de diversos locais, principalmente do solo, água doce e água do mar (W. Ferreira & Sousa, 2000), uma vez que conseguem sobreviver e crescer em condições adversas, tais como oscilações de temperatura, pH, salinidade, tensão de oxigénio e disponibilidade de nutrientes (Barroso et al., 2014). De facto, a água é um importante veículo para a transmissão das micobactérias, sendo que, nas piscinas terapêuticas de hospitais, estas podem representar cerca de 33% dos microrganismos presentes nas mesmas, contribuindo amplamente para a prevalência de IACS (Adékambi, Salah, Khlif, Raoult, & Drancourt, 2006).

Visto as micobactérias estarem amplamente distribuídas no ambiente e, portanto, colonizarem os mesmos locais que as AVL, surgem interações entre ambas (Thomas & McDonnell, 2007). Existe evidência de que, à semelhança do que acontece com *L. pneumophila*, as AVL contribuem para a persistência e dispersão das micobactérias em meios aquáticos, funcionando como seus reservatórios. Estas interações entre as AVL e as micobactérias conduzem a alterações no genoma das bactérias, que ganham genes implicados na virulência e sobrevivência de macrófagos, tornando-se mais patogénicas para os humanos (Cateau et al., 2014).

2.2.2.3. Fatores de virulência de *Mycobacterium* spp.

As micobactérias são responsáveis por mortes de origem infecciosa, sendo que, apesar de a maioria destas mortes se deverem a micobactérias incluídas no complexo *M. tuberculosis*, também as MNT constituem uma ameaça de doença emergente. Apesar do seu papel infeccioso importante, pouco se sabe acerca dos mecanismos de virulência destes agentes patogénicos (Kennedy, Hiroshi Morisaki, & DiGiuseppe Champion, 2012). As micobactérias ambientais podem ser bactérias patogénicas de humanos, sendo que os principais fatores de risco incluem doença pulmonar obstrutiva crónica, fibrose cística,

doença de refluxo gástrico e imunodeficiência devido a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, cancro ou quimioterapia (Falkinham III, 2009).

Diversos estudos sobre a interação das micobactérias com AVL demonstram que estas bactérias podem sobreviver à fagocitose, permanecendo dentro de vacúolos de replicação, sendo esta captação muito semelhante à que ocorre pelos macrófagos humanos (Cateau et al., 2014). Durante esta interação as micobactérias alteram a sua estrutura celular, principalmente a da membrana exterior, uma vez que, após a captação pelas AVL, elas perdem a sua característica de resistência álcool-ácido (Falkinham III, 2009).

A primeira espécie de micobactérias que se verificou sobreviver em AVL foi a *Mycobacterium leprae*, embora a multiplicação bacteriana e a lise amebiana não tenham sido devidamente demonstradas (Greub & Raoult, 2004; Thomas & McDonnell, 2007). Esta bactéria causa lepra, uma doença degenerativa progressiva da pele e do sistema nervoso. Apesar de não haver certezas da sua forma de transmissão, a mais provável é através de aerossóis respiratórios. Existe evidência de que *M. leprae* consegue sobreviver durante longos períodos de tempo em duas espécies de AVL, facto que lhe permite uma maior permanência no ambiente e mais resistência a antibióticos e desinfetantes (Wheat et al., 2014).

Outras espécies de micobactérias envolvidas em doenças são a *Mycobacterium tuberculosis*, que causa tuberculose (Hagedorn et al., 2009) e a *Mycobacterium marinum*, que existe em ambientes aquáticos e é patogénica oportunista para o Homem, provocando uma infecção semelhante à tuberculose (Kennedy et al., 2012). Após serem aprisionadas nas AVL, tanto *M. tuberculosis* como *M. marinum* impedem a maturação dos fagolisossomas e replicam dentro de um vacúolo. Estas bactérias têm a capacidade de saírem das células hospedeiras sem causarem a lise das mesmas, ao formarem estruturas, designadas ejectossomas, que se contraem, formando um cetio à volta das bactérias, e que as guiam para fora dos hospedeiros (figura 10) (Hagedorn et al., 2009).

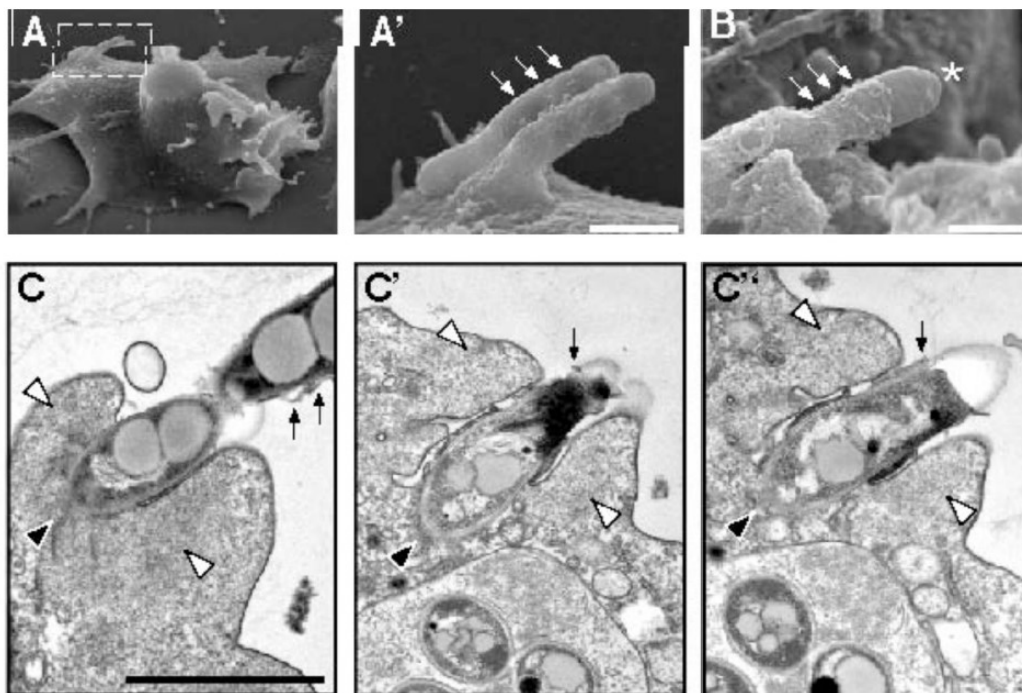


Figura 10. Células de AVL infectadas com micobactérias, fotografadas em microscopia eletrônica de varrimento (A, A' e B) e de transmissão (C, C' e C''). Nas imagens pode observar-se a saída das micobactérias do citosol da célula hospedeira sem causar lise amebiana (retirado e adaptado de Hagedorn et al., 2009).

Diversos estudos demonstram que existe um sistema de secreção que está presente em todas as micobactérias virulentas, sendo um elemento essencial para a invasão de amibas e para o crescimento das bactérias no seu interior (Cateau et al., 2014). Kennedy et al. (2012) estudaram os mecanismos implicados na virulência de *M. marinum* com o objetivo de perceber se estes eram idênticos para AVL e macrófagos. Assim, infetaram amibas com a estirpe selvagem de *M. marinum* ou com uma estirpe mutante com deleção de genes que codificam proteínas essenciais ao sistema de secreção necessário para a virulência das micobactérias. Observaram que a estirpe mutante teve uma redução de crescimento nas amibas em comparação com a estirpe selvagem. Outra das singularidades de *M. marinum* é a capacidade de usarem a actina disponível no citosol dos macrófagos para a sua motilidade. Estes rastros de actina foram visíveis nas AVL infetadas, mas apenas na estirpe selvagem (figura 11).

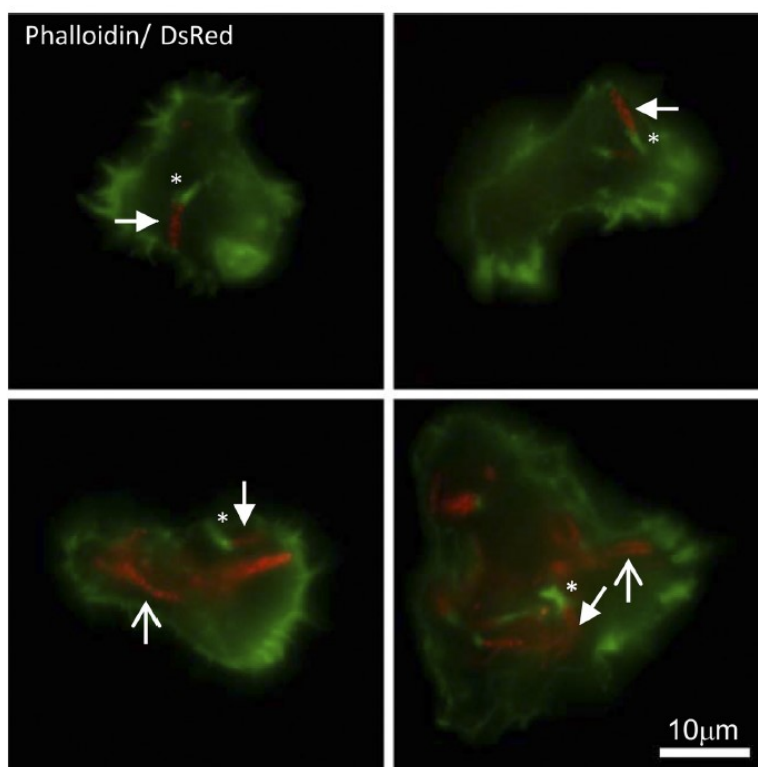


Figura 11. A estirpe selvagem de *M. marinum* forma rastros de actina, visíveis por microscopia de fluorescência (retirado de Kennedy et al., 2012).

Os autores concluíram que dois dos mecanismos necessários para infetar macrófagos são também necessários para infetar amibas, e que dependem de um sistema de secreção (Kennedy et al., 2012). No entanto, apesar deste sistema de secreção ser essencial para a propagação da infeção, não é necessário para a multiplicação dentro de macrófagos (Hagedorn et al., 2009; Salah, Ghigo, & Drancourt, 2009).

O facto da *M. marinum* poder apresentar uma motilidade baseada na actina já era conhecido de estudos anteriores, onde os autores concluíram que as bactérias, depois de entrarem na célula infetada, conseguem utilizar fatores do citoesqueleto da célula hospedeira para induzir a polimerização de actina, o que possibilita quer a sua propagação entre células, quer a inibição de algumas respostas imunitárias do hospedeiro (figura 12) (Stamm et al., 2003).

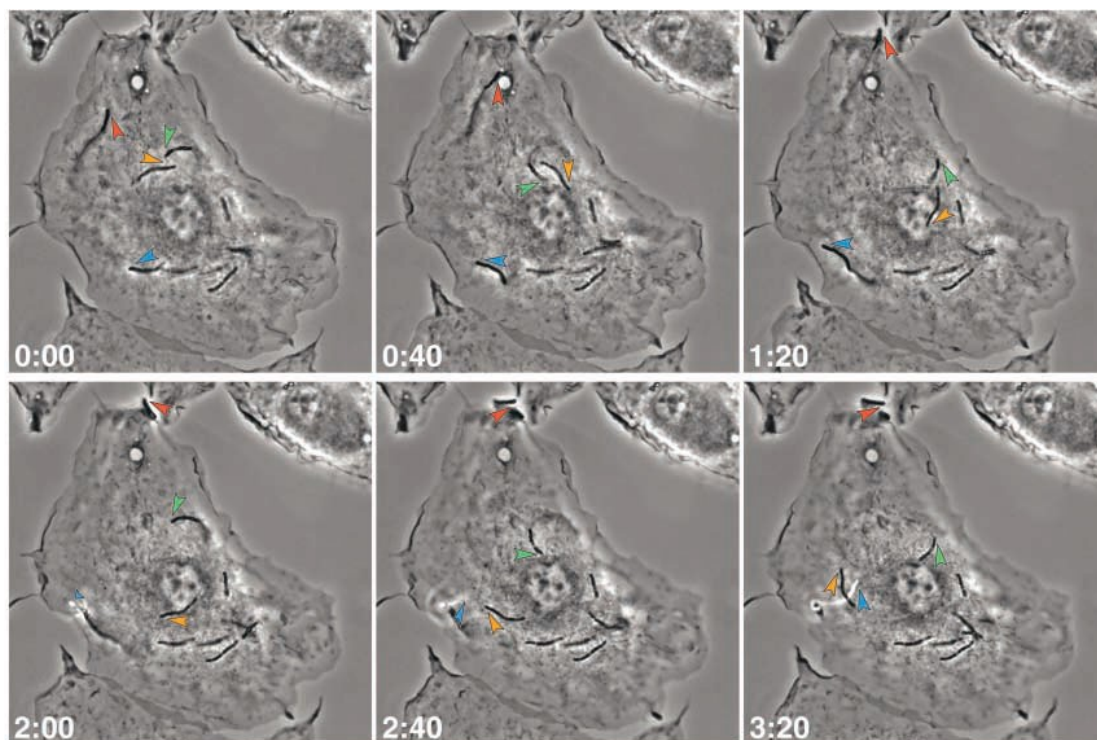


Figura 12. Imagens *time-lapse* onde é possível observar o movimento de *M. marinum* em macrófagos. Algumas bactérias estão indicadas por setas coloridas (retirado e adaptado de Stamm et al., 2003).

Outras bactérias que também estão relacionadas com as AVL são as do complexo *M. avium*, do qual fazem parte *M. avium* e *M. intracellulare*. Estas bactérias causam infecções respiratórias, principalmente em indivíduos imunodeprimidos (Falkinham III, 1996) e podem infectar diferentes células hospedeiras, nomeadamente os macrófagos. Nestas células fagocíticas o *M. avium* estabelece uma infecção a longo prazo, havendo evidência de que proteínas efetoras são responsáveis pela entrada destas bactérias nos macrófagos, embora existam outros mecanismos para sua captação pelos macrófagos, o que sugere que este processo é maioritariamente proactivo (Danelishvili et al., 2007).

Mycobacterium xenopi é uma micobactéria muitas vezes implicada em IACS, podendo causar ILC ou pneumonia. Num estudo de 2007, os autores avaliaram a interação destas micobactérias com amibas e com células humanas. Demonstraram que *M. xenopi* é uma bactéria intracelular facultativa, pois foi observada a sua internalização em células pulmonares embrioides humanas, que não são células fagocíticas especializadas. Nas amibas, a *M. xenopi* permaneceu e replicou-se no interior de vacúolos (figura 13). Para além disso, as micobactérias que proliferam em amibas adquirem mecanismos que lhes permitem resistir a condições ambientais adversas e antibióticos antimicrobianos (Drancourt, Adékambi, & Raoult, 2007).

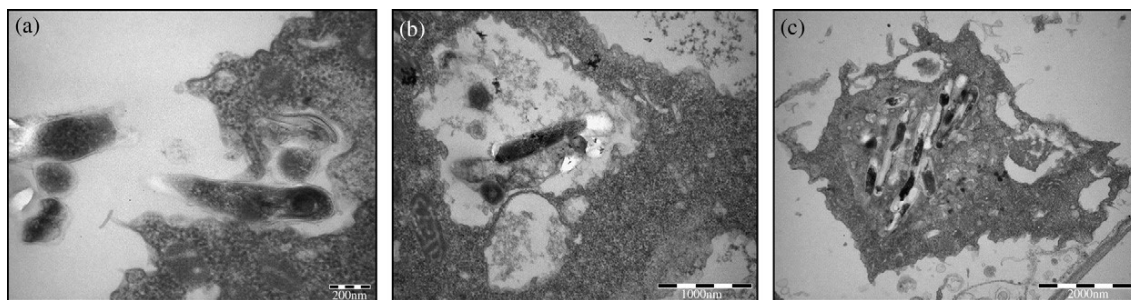


Figura 13. Observação ao microscópio eletrônico de transmissão da fagocitose de *M. xenopi* por *A. polyphaga*. (a) captação da micobactéria 5 minutos após a inoculação. (b) observação da micobactéria 24 horas após a inoculação. (c) micobactéria em divisão 6 dias após a inoculação (retirado de Drancourt et al., 2007).

Outra micobactéria que pode existir no interior das AVL é a *M. ulcerans*, que provoca uma infecção cutânea necrotizante, a úlcera de Buruli, que foi reportada em mais de 30 países, maioritariamente tropicais e subtropicais. A *M. ulcerans* depende das AVL para a sua patogenicidade, uma vez que não consegue viver livremente, provavelmente devido à sua fragilidade natural e à impossibilidade de exposição à luz solar direta. Apesar de não se multiplicar dentro das AVL, a *M. ulcerans* consegue persistir dentro delas e resistir a fatores desfavoráveis à sua sobrevivência (Amissah et al., 2014).

Existem diversos relatos de IACS associadas a micobactérias (Drancourt, 2014). Na Colômbia, 350 pacientes apresentaram infecções no local de administração de lidocaína, em que, apesar de terem sido administradas num único consultório médico, a fonte não foi identificada (Villanueva et al., 1997). No Brasil, *M. massiliense* causou infecção em centenas de pacientes, devido ao uso de instrumentos cirúrgicos mal esterilizados (Duarte et al., 2009). *M. xenopi* causou infecções após discectomias, em França (Astagneau et al., 2001), e foi isolado de AVL num tanque de água hospitalar (Thomas, Blanc, Bille, & Greub, 2005).

2.2.3. *Campylobacter jejuni* como simbiote facultativo das AVL

Campylobacter jejuni pertence à família Campylobacteriaceae (Murray et al., 2015). Esta bactéria é Gram negativa, com forma de espiral (Karlyshev, Vieira, & Seddon, 2015). *C. jejuni* é microaerófila, requerendo concentrações baixas de oxigénio, e um estreito intervalo de temperaturas (entre 37°C e 43°C), para que o seu crescimento seja ótimo (Axelsson-Olsson, Olofsson, et al., 2010). É uma bactéria bastante sensível ao

stress ambiental e tem dificuldade em sobreviver fora de um hospedeiro de sangue quente (Axelsson-Olsson, Olofsson, et al., 2010; Karlyshev et al., 2015).

2.2.3.1. Ecologia de *Campylobacter jejuni*

C. jejuni é a principal causa de enterite bacteriana no ocidente (Axelsson-Olsson, Olofsson, et al., 2010) e a zoonose mais frequentemente reportada na União Europeia (Olofsson, Axelsson-Olsson, Brudin, Olsen, & Ellström, 2013), estimando-se que cerca de 1% da população europeia é afetada por ano (Indikova, Humphrey, & Hilbert, 2015). Os sintomas desta doença gastrointestinal aguda incluem febre, diarreia e cólicas abdominais (Young, Davis, & Dirita, 2007). A bactéria faz parte do trato digestivo dos animais, principalmente aves, para as quais não é patogénica (Barroso et al., 2014). Os humanos são infetados por este organismo patogénico através da ingestão de alimentos contaminados, principalmente carne de aves mal cozinhada (Axelsson-Olsson, Svensson, et al., 2010a; Karlyshev et al., 2015; Olofsson et al., 2013), leite não pasteurizado (Olofsson et al., 2013) e água contaminada (Barroso et al., 2014).

2.2.3.2. Fatores de virulência de *Campylobacter jejuni*

C. jejuni é capaz de invadir, sobreviver e multiplicar-se dentro de organismos eucariotas unicelulares, mas os seus mecanismos moleculares e celulares ainda não são claros (Olofsson et al., 2013). O facto de *C. jejuni* conseguir residir em amibas, mesmo que por um curto espaço de tempo, pode acentuar a importância epidemiológica desta bactéria, pois a sua probabilidade de transmissão aumenta (Karlyshev et al., 2015).

Num estudo de 2005 foi investigada a sobrevivência intracelular de *C. jejuni* em *Acanthamoeba polyphaga* a várias temperaturas, onde se observou que para todas as temperaturas testadas, em determinados locais da membrana celular desta amiba ocorria a formação de agregados de células bacterianas (figura 14). Para além de *C. jejuni* ser capaz de aderir ao hospedeiro amebiano, também se verificou que a bactéria conseguia permanecer viva e móvel dentro de vacúolos de *A. polyphaga*. Desta forma, a bactéria consegue sobreviver a temperaturas baixas, desfavoráveis ao seu crescimento, se permanecer dentro de AVL, que servem como proteção a condições ambientais adversas (Axelsson-Olsson, Waldenström, Broman, Olsen, & Holmberg, 2005).

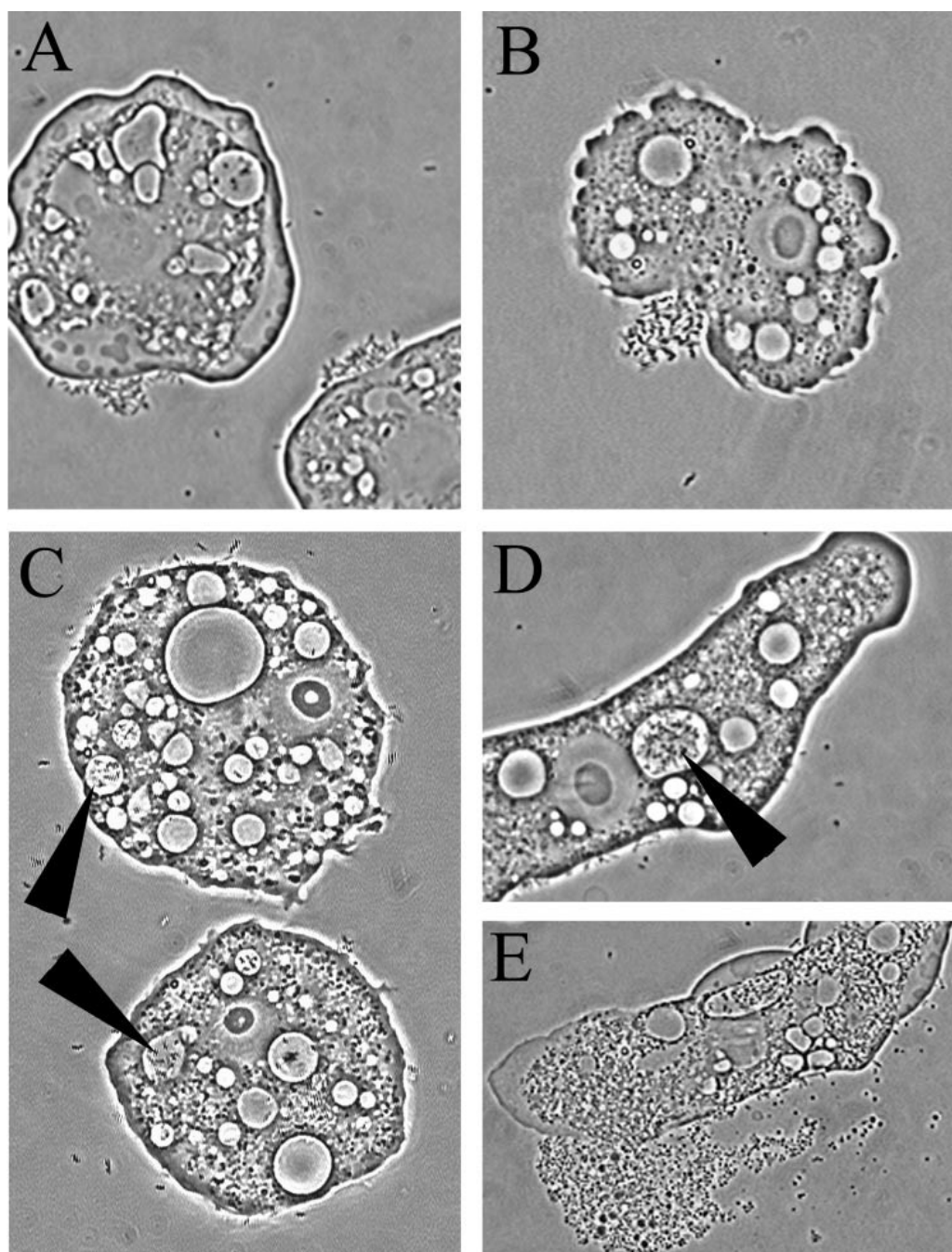


Figura 14. As células de *C. jejuni* concentram-se em determinados locais da membrana celular de *A. polyphaga* (A e B) e, após algum tempo, encontram-se em vacúolos amebianos (C, D e E) (retirado de Axelsson-Olsson et al., 2005).

Axelsson-Olsson et al. (2010) demonstraram que *Campylobacter* spp. utiliza organismos eucariotas de diferentes origens e com diferentes características, principalmente AVL, para sobreviver e replicar-se. Assim, as bactérias conseguem sobreviver no ambiente por períodos de tempo mais prolongados (Axelsson-Olsson, Olofsson, et al., 2010).

A captação de *C. jejuni* pelas células hospedeiras é dependente da sua viabilidade, uma vez que a inativação da síntese proteica reduz a quantidade de bactérias capazes de invasão, mas não impede a sua união. De facto, a cinética de internalização varia bastante consoante sejam bactérias viáveis ou mortas pelo calor. As primeiras são captadas a uma taxa superior durante as primeiras 24 horas, o que sugere que a invasão é induzida pelas bactérias. As bactérias mortas pelo calor, por outro lado, ligavam-se escassamente à superfície das amibas, mas encontravam-se dentro de vacúolos. Para além disso, as bactérias viáveis encontravam-se igualmente distribuídas em vacúolos digestivos e não-digestivos, sendo que com o passar do tempo, concentraram-se nos vacúolos não-digestivos, ao contrário das bactérias mortas pelo calor. Esta observação sugere que *C. jejuni* possui mecanismos que lhe permitem escapar às vias de degradação da amiba, permitindo a sua sobrevivência intracelularmente (Olofsson et al., 2013).

Outra evidência de como *C. jejuni* utiliza as AVL para se proteger de ambientes desfavoráveis foi apresentada por Axelsson-Olsson et al. (2010). O ácido gástrico presente no estômago constitui um importante mecanismo de defesa contra microrganismos patogénicos ingeridos. Verificou-se que, a um pH baixo, entre 4 e 5, *C. jejuni* consegue migrar para um ambiente protetor, ao ser internalizada por AVL, o que permite à bactéria permanecer patogénica para o Homem (Axelsson-Olsson, Svensson, et al., 2010b).

CAPÍTULO III – CONCLUSÕES

Atualmente, a nível mundial, as infeções associadas aos cuidados de saúde constituem uma das complicações mais prevalentes nos doentes hospitalizados, ou que recebem outros cuidados de saúde noutros locais. Uma vez que este problema é global, e afeta grande número de doentes, é importante estudar os seus fatores de risco e estabelecer medidas que previnam estas infeções.

Existem diversos microrganismos etiológicos de IACS, entre os quais, bactérias, fungos e vírus. No entanto, estas infeções também podem ser causadas por protozoários, nomeadamente por AVL. Estas são seres ubiquitários e muito abundantes no ambiente, podendo ser isoladas não só de fontes naturais, mas também de ecossistemas de origem humana. O interesse por estes microrganismos tem vindo a crescer porque, apesar de não ocorrerem com muita frequência, podem estar diretamente envolvidas na infeção enquanto agente causal, ou de forma indireta por constituírem reservatórios para outros organismos patogénicos que desenvolveram mecanismos que lhes permitem escapar à digestão por AVL.

Dentro das espécies patogénicas, as mais frequentemente envolvidas em infeções humanas são *Acanthamoeba* spp. e *Balamuthia mandrillaris*, que podem causar EGA e infeções sistémicas em indivíduos imunocomprometidos, e *Naegleria fowleri*, que pode causar MPA em indivíduos saudáveis. Todas estas infeções podem ter consequências graves e progredir para morte.

Quanto ao seu papel de reservatório, as AVL ao serem altamente resistentes a condições adversas, podem proteger diferentes microrganismos de tratamentos de desinfecção, favorecendo a sua permanência no ambiente. Desta forma, podem contribuir para a disseminação destes agentes microbiológicos e também para o aumento da probabilidade de causarem infeções.

Entre os diversos microrganismos que têm capacidade para sobreviver no interior das AVL e que podem usufruir das vantagens que resultam das interações que com elas estabelecem, destacam-se as bactérias, e em particular, a *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* spp., e a *Campylobacter jejuni*. Assim, estas bactérias ao permanecerem no interior das AVL, para além da proteção que adquirem relativamente às condições adversas do meio ambiente, têm também a possibilidade de as usar como “centro de

treino” para evadirem algumas defesas imunitárias do Homem, nomeadamente no que concerne à aquisição de resistência aos macrófagos, pelo facto das AVL serem bastante semelhantes a estas células fagocíticas.

As AVL, ao serem seres ubiqüitários podem estar presentes em locais onde são prestados cuidados de saúde, onde se encontram, muitas vezes, indivíduos com sistema imunitário comprometido. Assim, estas amibas têm oportunidade para provocarem infeção mais facilmente, quando pertencem às espécies infecciosas para o Homem, e, também, para aumentarem a probabilidade de existirem infeções provocadas pelos microrganismos que transportam e abrigam.

O facto das AVL protegerem os microrganismos que alojam coloca ainda outros problemas a nível dos serviços de saúde, nomeadamente a possibilidade de contribuírem para a resistência das bactérias a antibióticos. Outra questão é a relacionada com os procedimentos de desinfeção e limpeza, pois estes estão centrados na eliminação de microrganismos mais patogénicos, com desinfetantes aos quais as AVL são resistentes. Assim, estas condutas podem não ser totalmente eficazes, uma vez que as bactérias podem permanecer protegidas no interior das amibas resistentes, permanecendo o risco de infeção.

No futuro é importante ser considerada uma abordagem de eliminação dos agentes biológicos que contaminam os diversos materiais, instrumentos e meio ambiente hospitalar e de outros serviços de saúde, eficaz também para as AVL, porque só desta forma o risco de IACS pode ser verdadeiramente reduzido.

CAPÍTULO IV – BIBLIOGRAFIA

- Acanthamoeba biology. (2012). Disponível a 13 de novembro de 2016, em <http://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/biology.html>
- Adékambi, T., Salah, S. Ben, Khlif, M., Raoult, D., & Drancourt, M. (2006). Survival of environmental mycobacteria in Acanthamoeba polyphaga. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5974–5981. <http://doi.org/10.1128/AEM.03075-05>
- Aires, E. (2011). *Avaliação de custos associados à infeção do local cirúrgico nos serviços de cirurgia geral do Hospital Geral Santo António* (Tese de Mestrado). Universidade Católica Portuguesa, Portugal. Disponível em [http://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/8820/1/ESTUDO DE CUSTOS - Ernestina Aires.pdf](http://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/8820/1/ESTUDO_DE_CUSTOS_-_Ernestina_Aires.pdf)
- Almeida, A. (2014). Custos hospitalares associados às IACS. Disponível em http://www.apih.pt/congresso_2014/13_custos_hospitalares.pdf
- Amissah, N. A., Gryseels, S., Tobias, N. J., Ravadgar, B., Suzuki, M., Vandellannoote, K., ... Eddyani, M. (2014). Investigating the role of free-living amoebae as a reservoir for Mycobacterium ulcerans. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(9). <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003148>
- Astagneau, P., Desplaces, N., Vincent, V., Chicheportiche, V., Botherel, A. H., Maugat, S., ... Brücker, G. (2001). Mycobacterium xenopi spinal infections after discovertebral surgery: Investigation and screening of a large outbreak. *Lancet*, 358(9283), 747–751. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05843-3](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05843-3)
- Axelsson-Olsson, D., Olofsson, J., Svensson, L., Griekspoor, P., Waldenström, J., Ellström, P., & Olsen, B. (2010). Amoebae and algae can prolong the survival of Campylobacter species in co-culture. *Experimental Parasitology*, 126(1), 59–64. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.12.016>
- Axelsson-Olsson, D., Svensson, L., Olofsson, J., Salomon, P., Waldenström, J., Ellström, P., & Olsen, B. (2010). Increase in acid tolerance of Campylobacter jejuni through coinubation with amoebae. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4194–4200. <http://doi.org/10.1128/AEM.01219-09>

- Axelsson-Olsson, D., Waldenström, J., Broman, T., Olsen, B., & Holmberg, M. (2005). Protozoan *Acanthamoeba polyphaga* as a potential reservoir for *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 987–992. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.2.987-992.2005>
- Bakardjiev, A., Azimi, P., Ashouri, N., Ascher, D., Janner, D., Schuster, F., ... Glaser, C. (2003). Amebic encephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris*: report of four cases. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 22(5), 447–453. <http://doi.org/10.1097/01.inf.00000066540.18671.f8>
- Barroso, H., Meliço-Silvestre, A., & Taveira, N. (2014). *Microbiologia Médica, vol. 1*. Lidel.
- Bartram, J. (2007). *Legionella and the Prevention of Legionellosis*. (J. Bartram, Ed.). World Health Organization.
- Cardoso, R. (2015). *As infeções associadas aos cuidados de saúde* (Tese de Mestrado). Faculdade de Economia da Universidade de Coimbra, Portugal.
- Cateau, E., Delafont, V., Hechard, Y., & Rodier, M. H. (2014). Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections? *Journal of Hospital Infection*, 87(3), 131–140. <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.05.001>
- Centro Hospitalar de Lisboa Central (2015). *Prevenção da Infeção do Local Cirúrgico no Adulto*. Lisboa.
- Danelishvili, L., Wu, M., Stang, B., Harrieff, M., Cirillo, S. L. G., Cirillo, J. D., ... Bermudez, L. E. (2007). Identification of *Mycobacterium avium* pathogenicity island important for macrophage and amoeba infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(26), 11038–11043. <http://doi.org/10.1073/pnas.0610746104>
- Direcção-Geral da Saúde. (2007). Programa nacional de prevenção e controlo da infecção associada aos cuidados de saúde. Disponível em <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i008902.pdf>
- Drancourt, M. (2014). Looking in amoebae as a source of mycobacteria. *Microbial Pathogenesis*, 77, 119–124. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.07.001>

- Drancourt, M., Adékambi, T., & Raoult, D. (2007). Interactions between *Mycobacterium xenopi*, amoeba and human cells. *Journal of Hospital Infection*, 65(2), 138–142. <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2006.10.006>
- Duarte, R. S., Lourenço, M. C. S., Fonseca, L. D. S., Leão, S. C., Amorim, E. D. L. T., Rocha, I. L. L., ... Sampaio, J. L. M. (2009). Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(7), 2149–2155. <http://doi.org/10.1128/JCM.00027-09>
- Ducel, G., Fabry, J., & Nicolle, L. (2002). Prevention of hospital-acquired infections. *World Health Organization*. <http://doi.org/WHO/CDS/CSR/EPH/2002.12>
- Dunnebacke, T. H., Schuster, F. L., Yagi, S., & Booton, G. C. (2004). *Balamuthia mandrillaris* from soil samples. *Microbiology*, 150(9), 2837–2842. <http://doi.org/10.1099/mic.0.27218-0>
- Emori, T. G., & Gaynes, R. P. (1993). An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*, 6(4), 428–442. <http://doi.org/10.1128/CMR.6.4.428>
- Falkinham III, J. O. (1996). Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(2), 177–215.
- Falkinham III, J. O. (2009). The biology of environmental mycobacteria. *Environmental Microbiology Reports*. <http://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00054.x>
- Fernandes, S. (2013). *Mortalidade, morbilidade e custo económico de infeções hospitalares resistentes a antibióticos na Europa* (Tese de Mestrado). Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal.
- Ferreira, A. (2011). *A adesão dos enfermeiros na adopção das medidas de precaução padrão quanto ao uso dos equipamentos de protecção individual* (Tese de Mestrado). Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa, Portugal.
- Ferreira, W., & Sousa, J. (2000). *Microbiologia*, vol. 2. Lidel.
- Franco, I. S., Shuman, H. A., & Charpentier, X. (2009). The perplexing functions and surprising origins of *Legionella pneumophila* type IV secretion effectors. *Cellular Microbiology*, 11(10), 1435–43. <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01351.x>

- Free living amebic infections. (2013). Disponível a 13 de novembro de 2016, em <http://www.cdc.gov/dpdx/freeLivingAmebic/>
- Gockel-Blessing, E. A. (2013). *Clinical parasitology: a practical approach*. Elsevier Saunders.
- Goulão, I. (2014). *Infeções associadas aos cuidados de saúde* (Tese de Mestrado). Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Portugal.
- Greub, G., & Raoult, D. (2004). Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2), 413–433. <http://doi.org/10.1128/CMR.17.2.413-433.2004>
- Hagedorn, M., Rohde, K. H., Russell, D. G., & Soldati, T. (2009). Infection by tubercular mycobacteria is spread by nonlytic ejection from their amoeba hosts. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5922), 1729–33. <http://doi.org/10.1126/science.1169381>
- HAI data and statistics. (2016). Disponível a 28 de setembro de 2016, em <http://www.cdc.gov/HAI/surveillance/index.html>
- Head, M. G., Fitchett, J. R., Cooke, M. K., Wurie, F. B., Atun, R., Hayward, A. C., ... Woodford, N. (2014). Systematic analysis of funding awarded for antimicrobial resistance research to institutions in the UK, 1997-2010. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(2), 548–554. <http://doi.org/10.1093/jac/dkt349>
- Indikova, I., Humphrey, T. J., & Hilbert, F. (2015). Survival with a helping hand: *Campylobacter* and microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 6(NOV). <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01266>
- Isberg, O'Connor, & Heidtman. (2009). The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(1), 13–24. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1967>
- Janda, W. M. (2010). Amoeba-resistant bacteria: their role in human infections. *Clinical Microbiology Newsletter*, 32(23), 177–184. <http://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2010.11.001>
- Karlyshev, A. V., Vieira, A., & Seddon, A. M. (2015). *Campylobacter*–*Acanthamoeba* interactions. *Microbiology*, 161(5), 933–947. <http://doi.org/10.1099/mic.0.000075>

- Kennedy, G. M., Hiroshi Morisaki, J., & DiGiuseppe Champion, P. A. (2012). Conserved mechanisms of *Mycobacterium marinum* pathogenesis within the environmental amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 2049–2052. <http://doi.org/10.1128/AEM.06965-11>
- Klevens, R. M., Edwards, J. R., Richards Jr., C. L., Horan, T. C., Gaynes, R. P., Pollock, D. A., & Cardo, D. M. (2007). Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Rep*, 122(2), 160–166. <http://doi.org/10.2307/20057111>
- Mangram, A. J., Horan, T. C., Pearson, M. L., Silver, L. C., & Jarvis, W. R. (1999). Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. *Infection Control and Hospital Epidemiology: The Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*, 20(4), 250-78-80. <http://doi.org/10.1086/501620>
- Martinez, A. J. (1991). Infection of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. *Reviews of Infectious Diseases*, 13 Suppl 5, S399-402. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2047674>
- Martins, M. A. (2001). *Manual de infecção hospitalar - epidemiologia, prevenção e controle* (2ª edição). MEDSI.
- Matin, A., Siddiqui, R., Jayasekera, S., & Khan, N. A. (2008). Increasing importance of *Balamuthia mandrillaris*. *Clinical Microbiology Reviews*. <http://doi.org/10.1128/CMR.00056-07>
- Matz, C., & Kjelleberg, S. (2005). Off the hook - how bacteria survive protozoan grazing. *Trends in Microbiology*, 13(7), 302–307. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2005.05.009>
- Mendes, J. (2013). *Infeções nosocomiais em Portugal: prevalência, controlo e terapêutica* (Tese de Mestrado). Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal.
- Moliner, C., Fournier, P. E., & Raoult, D. (2010). Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(3), 281–294. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00209.x>

- Molmeret, M., Bitar, D. M., Han, L., & Kwaik, Y. A. (2004). Disruption of the phagosomal membrane and egress of *Legionella pneumophila* into the cytoplasm during the last stages of intracellular infection of macrophages and *Acanthamoeba polyphaga*. *Infection and Immunity*, 72(7), 4040–4051. <http://doi.org/10.1128/IAI.72.7.4040-4051.2004>
- Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., & Santic, M. (2005). Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 20–28. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.1.20>
- Monteiro, G. (2012). *Prevenção e controlo da infeção associada a cuidados de saúde (IACS): higienização das mãos, uma prática na segurança do doente* (Tese de Mestrado). Universidade da Beira Interior, Portugal.
- Mourud, H. (2010). *Prevention of nosocomial infections* (Tese de Mestrado). Charles University, República Checa.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2015). *Medical microbiology* (8th edition).
- Olofsson, J., Axelsson-Olsson, D., Brudin, L., Olsen, B., & Ellström, P. (2013). *Campylobacter jejuni* actively invades the amoeba *Acanthamoeba polyphaga* and survives within non digestive vacuoles. *PLoS ONE*, 8(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0078873>
- Owens, C. D., & Stoessel, K. (2008). Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention. *Journal of Hospital Infection*, 70(SUPPL. 2), 3–10. [http://doi.org/10.1016/S0195-6701\(08\)60017-1](http://doi.org/10.1016/S0195-6701(08)60017-1)
- Pathogen & Environment of *Balamuthia mandrillaris*. (2016). Disponível a 13 de novembro de 2016, em <http://www.cdc.gov/parasites/balamuthia/pathogen.html>
- Pina, E., Ferreira, E., Marques, A., & Matos, B. (2010). Infecções associadas aos cuidados de saúde e segurança do doente. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 10(10), 27–39.
- Pina, E., Paiva, J., Nogueira, P., & Silva, M. (2012). Prevalência de infeção adquirida no hospital e do uso de antimicrobianos nos hospitais portugueses. <http://doi.org/http://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/inquerito-de-prevalencia-de-infecao-adquirida-no-hospital-e-uso-de-antimicrobianos-nos-hospitais-portugueses-inquerito-2012-jpg.aspx>

- Rey, L. (1992). *Bases da parasitologia médica*. Guanabara Koogan.
- Richards, A. M., Von Dwingelo, J. E., Price, C. T., & Abu Kwaik, Y. (2013). Cellular microbiology and molecular ecology of Legionella-amoeba interaction. *Virulence*, 4(4), 307–14. <http://doi.org/10.4161/viru.24290>
- Ruiz Tovar, J., & Badia, J. M. (2014). Prevention of surgical site infection in abdominal surgery. A critical review of the evidence. *Cirugía Española (English Edition)*, 92(4), 223–231. <http://doi.org/10.1016/j.cireng.2013.08.003>
- Salah, I. B., Ghigo, E., & Drancourt, M. (2009). Free-living amoebae, a training field for macrophage resistance of mycobacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(10), 894–905. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03011.x>
- Samuelsson, A. (2013). *The faecal flora: a source of healthcare-associated infections and antibiotic resistance* (Tese de Mestrado). Faculty of Health Science of Linköping University, Suécia.
- Schuster, F. L., & Visvesvara, G. S. (2004a). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*, 34(9), 1001–1027. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.06.004>
- Schuster, F. L., & Visvesvara, G. S. (2004b). Opportunistic amoebae: Challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resistance Updates*. <http://doi.org/10.1016/j.drug.2004.01.002>
- Seal, D. V. (2003). Acanthamoeba keratitis update—incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye*, 17(8), 893–905. <http://doi.org/10.1038/sj.eye.6700563>
- SinghN, N., Sprague, B. M., Patel, K. M., & Pollack, M. M. (1996). Risk factors for nosocomial infection in critically ill children: A prospective cohort study. *CRITICAL CARE MEDICINE*, 24(5), 875–878. <http://doi.org/10.1097/00003246-199605000-00024>
- Stamm, L. M., Morisaki, J. H., Gao, L. Y., Jeng, R. L., McDonald, K. L., Roth, R., ... Brown, E. J. (2003). Mycobacterium marinum escapes from phagosomes and is propelled by actin-based motility. *J Exp Med*, 198(9), 1361–1368. <http://doi.org/10.1084/jem.20031072>

- Suetens, C., Hopkins, S., Kolman, J., & Hogberg, L. (2013). Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals, 2011-2012. European Center for Disease Prevention and Control.
- Tender, A. (n.d.). Formação e investigação em prevenção e controlo da infeção. Disponível em http://www.apih.pt/seminario_viana_2014/sem_viana_ap09_enfa_agripina_tender.pdf
- Thomas, V., Blanc, D., Bille, J., & Greub, G. (2005). Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Abstracts of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 318. <http://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2428>
- Thomas, V., & McDonnell, G. (2007). Relationship between mycobacteria and amoebae: ecological and epidemiological concerns. *Letters in Applied Microbiology*, 45(4), 349–357. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02206.x>
- Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., ... Ayadi, A. (2012). Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathologie Biologie*, 60(6), 399–405. <http://doi.org/10.1016/j.patbio.2012.03.002>
- Ugonabo, J. A., & Gugnani, H. C. (1989). Nasal carriage of *Naegleria fowleri* and its environmental occurrence in Borno State, Nigeria. *Journal of Communicable Diseases*, 21(2), 111–113.
- Ulger, F., Dilek, A., Esen, S., Sunbul, M., & Leblebicioglu, H. (2015). Are healthcare workers mobile phones a potential source of nosocomial infections? Review of the literature. *Journal of Infection in Developing Countries*, 9(10), 1046–1053. <http://doi.org/10.3855/jidc.6104>
- Villanueva, A., Calderon, R. V, Vargas, B. A., Ruiz, F., Agüero, S., Zhang, Y., ... Wallace, R. J. (1997). Report on an outbreak of postinjection abscesses due to *Mycobacterium abscessus*, including management with surgery and clarithromycin therapy and comparison of strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 24(6), 1147–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9195073>

- Visvesvara, G. S., Moura, H., & Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 50(1), 1–26. <http://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x>
- Wheat, W. H., Casali, A. L., Thomas, V., Spencer, J. S., Lahiri, R., Williams, D. L., ... Jackson, M. (2014). Long-term survival and virulence of *Mycobacterium leprae* in amoebal cysts. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(12). <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003405>
- Winiecka-Krusnell, J., & Linder, E. (2001). Bacterial infections of free-living amoebae. *Research in Microbiology*, 152(7), 613–619. [http://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01240-2](http://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01240-2)
- Wood, R. E., Newton, P., Latomanski, E. A., & Newton, H. J. (2015). Dot/Icm effector translocation by *Legionella longbeachae* creates a replicative vacuole similar to that of *Legionella pneumophila* despite translocation of distinct effector repertoires. *Infection and Immunity*, 83(10), 4081–4092. <http://doi.org/10.1128/IAI.00461-15>
- World Health Organization. (2002). Prevention of hospital-acquired infections.
- Young, K. T., Davis, L. M., & Dirita, V. J. (2007). *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(9), 665–679. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1718>
- Zarb, P., Coignard, B., Griskeviciene, J., Muller, A., Vankerckhoven, V., Weist, K., ... Hospital Contact Points for the ECDC pilot point prevalence survey. (2012). The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. *Euro Surveillance : Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 17(46). <http://doi.org/10.2900/86011>
- Zhao, B., Li, X., Zeng, Y., & Lu, Y. (2016). ClpP-deletion impairs the virulence of *Legionella pneumophila* and the optimal translocation of effector proteins. *BMC Microbiology*, 16(1), 174. <http://doi.org/10.1186/s12866-016-0790-8>